

**MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZU
GENETISCHEN VARIANTEN DES DOPAMINERGEN SYSTEMS IM
TIERMODELL UND BEIM MENSCHEN**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

"Doktor der Naturwissenschaften"

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

Sabine Germeyer

geb. in St. Ingbert/Saar

Mainz, 2000

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Der Neurotransmitter Dopamin	1
1.2	Die Dopaminrezeptoren	2
1.2.1	Funktion und Vorkommen von Dopaminrezeptoren	2
1.2.2	Die Gene der Dopaminrezeptoren	2
1.2.3	Polymorphismen der Dopaminrezeptorgene	4
1.3	Die Tyrosinhydroxylase und der Dopamintransporter - zwei wichtige Proteine im dopaminergen System	5
1.4	Erkrankungen mit Beteiligung des dopaminergen Systems	6
1.4.1	Alkoholabhängigkeit.....	7
1.5	Möglichkeiten zur Untersuchung von krankheitsassoziierten Veränderungen im dopaminergen System	8
1.5.1	Verhaltensuntersuchungen am Tier	9
1.5.2	Der Apomorphintest bei Patienten	11
1.5.3	Ein psychologisches Modell: das dimensionale Persönlichkeitsmodell von Cloninger	14
1.5.4	Polymorphismen-Untersuchungen und Assoziationsstudien	15
1.6	Zielsetzung.....	18
2	MATERIAL UND METHODEN	19
2.1	Materialien und Geräte.....	19
2.1.1	Puffer und Lösungen	19
2.1.2	Enzyme.....	20
2.1.3	Immunoassays.....	20
2.1.4	Rattenstämme	20
2.1.5	Molekulargewichtsstandards.....	21
2.1.6	Synthetische Oligonukleotide.....	21
2.1.7	Chemikalien und Materialien	23
2.2	Versuchstiere.....	25
2.2.1	Apomorphintest und Verhaltenstest	25
2.2.2	Auswahl der Tiere für die Sequenzierung der Dopaminrezeptorgene D ₁ und D ₂	26

2.3 Patienten- und Kontrollprobandenstichproben.....	27
2.3.1 Patientenstichprobe	27
2.3.2 Subgruppierung der Patientenstichprobe nach Cloninger	28
2.3.3 Kontrollprobandenstichprobe	28
2.4 Das Temperament- und Charakter-Inventar (TCI)	29
2.5 Apomorphintest bei alkoholabhängigen Patienten.....	30
2.6 Isolierung von DNA und RNA.....	31
2.6.1 Isolierung von DNA aus Blut	31
2.6.2 Isolierung von RNA	31
2.7 DNA- und RNA-Standardmethoden	32
2.7.1 Restriktionsverdau	32
2.7.2 Agarose-Gelelektrophorese von DNA	32
2.7.3 Agarose-Gelelektrophorese von RNA	33
2.7.4 Aufreinigung von DNA über Agarosegele	33
2.7.5 Fällung von DNA.....	33
2.8 Polymerase-Ketten-Reaktion	34
2.9 Reaktionen zur Darstellung der DNA-Sequenz-Polymorphismen.....	35
2.9.1 Der Bsp1286I RFLP des D ₁ -Rezeptorgens	35
2.9.2 Der TaqI A RFLP des D ₂ -Rezeptorgens.....	36
2.9.3 Der MscI (BclI) RFLP des D ₃ -Rezeptorgens	36
2.9.4 Der Exon III Polymorphismus des D ₄ -Rezeptorgens (48bp-repeat).....	37
2.9.5 Der VNTR Polymorphismus des Dopamintransportergens1 (40bp-repeat)	37
2.9.6 Der Val81Met RFLP des Tyrosinhydroxylasegens	38
2.9.7 Der -141C Ins/Del-Polymorphismus des D ₂ -Rezeptorgens	39
2.9.8 Der A-241G-Polymorphismus des D ₂ -Rezeptorgens.....	39
2.10 Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR).....	40
2.11 DNA-Sequenzierung.....	40
2.12 Computerauswertung von DNA-Sequenzen.....	41
2.13 Verwendete Datenbanksequenzen für die Sequenzvergleiche der Dopaminrezeptorgene der Ratten	41
2.13.1 Vergleichssequenz D ₁	41
2.13.2 Vergleichssequenz D ₂	42

2.14	Statistische Auswertung der Daten	43
2.14.1	Statistische Auswertung der Allel- und Genotypenfrequenzen von Patienten und Kontrollprobanden	43
2.14.2	Einteilung der untersuchten Probanden auf der Basis der Allele des Dopaminrezeptors D2 und des Dopamintransporters und statistische Auswertung	43
2.14.3	Statistische Auswertung der Assoziationsstudie zwischen den Temperamentsfaktoren und dem Exon III Polymorphismus des D ₄ -Rezeptorgens	44
2.14.4	Statistische Auswertung des Apomorphintests	45
3	ERGEBNISSE	46
3.1	Molekularbiologische Untersuchung der Dopaminrezeptorgene D₁ und D₂ von Ratten charakterisiert in einem pharmakologischen Verhaltensmodell	46
3.1.1	Die Strategie zur Sequenzierung der Dopaminrezeptorgene D ₁ und D ₂	46
3.1.1.1	Auswahl der Tiere.....	46
3.1.1.2	Auswahl des Sequenzierbereichs der Rezeptorgene D ₁ und D ₂	47
3.1.1.3	Darstellung der sequenzierten Region der Dopaminrezeptorgene.....	48
3.1.2	Sequenzanalyse der Dopaminrezeptorgene D ₁ und D ₂ der "Nager" und "Schnüffler"	51
3.1.3	Die Sequenz des Dopaminrezeptorgens D ₁ der "Nager" und "Schnüffler"	51
3.1.4	Die Sequenz des Dopaminrezeptorgens D ₂ der "Nager" und "Schnüffler"	54
3.1.5	Identifizierung und Charakterisierung von zwei Polymorphismen in der Promotorregion des D ₂ -Rezeptorgens von Wistar Ratten	56
3.1.5.1	Auftreten von zwei Allelen in der Promotorregion des D ₂ -Rezeptorgens.....	56
3.1.5.2	Isotypisierung des T-355C-Polymorphismus und des A-257G-Polymorphismus	58
3.1.6	Auftreten der Polymorphismen im D ₂ -Rezeptorgen von zwei weiteren Rattenstämmen	59
3.1.7	Assoziation der Polymorphismen mit unterschiedlicher lokomotorischer Aktivität bei Wistar Ratten	60

3.2 Untersuchung der D₂-Rezeptorsensitivität bei alkoholabhängigen Patienten nach Apomorphingabe (Apomorphintest)	61
3.2.1 Neuroendokrine Reaktionen nach Apomorphingabe	61
3.2.2 Genotypen und Allelfrequenzen von drei Polymorphismen des D ₂ -Rezeptorgens und neuroendokrine Reaktion auf Apomorphin	63
3.2.2.1 Genotypen und Allelfrequenzen	63
3.2.2.2 Apomorphinreaktionen in Abhängigkeit vom D ₂ -Rezeptorgenotyp	65
3.3 Untersuchung von DNA-Sequenz-Polymorphismen des dopaminergen Systems bei alkoholabhängigen Patienten und Kontrollprobanden	67
3.3.1 Genotypen und Allelfrequenzen der Polymorphismen der Dopaminrezeptorgene D ₁ , D ₂ , D ₃ und des Tyrosinhydroxylasegens	67
3.3.2 Genotypen und Allelfrequenzen des Exon III Polymorphismus des Dopaminrezeptorgens D ₄	71
3.3.3 Genotypen und Allelfrequenzen des VNTR des Dopamintransportergens DAT1 74	74
3.3.4 Unterschiede in der Genotypenverteilung nach Einteilung der alkoholabhängigen Patienten in Typ I und Typ II nach Cloninger	76
3.3.5 Assoziationsstudie mit dem TaqI A Polymorphismus des D ₂ -Rezeptorgens und dem VNTR des Dopamintransportergens und der Alkoholabhängigkeit	77
3.4 Assoziationsstudie mit den Temperamentsfaktoren des TCI und dem Exon III Polymorphismus (48 bp repeat) des D₄-Rezeptorgens	78
3.4.1 Einteilung der Probanden und Gruppengrößen	78
3.4.2 Summenwerte der Persönlichkeitsfaktoren	79
3.4.3 Assoziation zwischen dem Exon III Polymorphismus (48 bp repeat) des D ₄ -Rezeptorgens und den Persönlichkeitsdimensionen	80
4 DISKUSSION	81
4.1 Tierexperimentelle Untersuchungen - lokomotorisches Verhalten von Ratten nach Stimulation mit Apomorphin	82
4.1.1 Genetische Variationen in den Dopaminrezeptorgenen der "Nager" und "Schnüffler"	82
4.1.2 Identifizierung genetischer Varianten der Dopaminrezeptorgene D ₁ und D ₂	84
4.1.3 Assoziation der Genotypen des D ₂ -Rezeptorgens mit dem Laufverhalten von Ratten	86

4.2 Untersuchungen zum dopaminergen System bei alkoholabhängigen Patienten	88
4.2.1 Effekte des Apomorphintests im dopaminergen System	88
4.2.2 Assoziationsuntersuchungen zwischen Polymorphismen des dopaminergen Systems und der Erkrankung der Alkoholabhängigkeit	90
4.2.2.1 Assoziationsstudie mit sechs Polymorphismen des dopaminergen Systems	90
4.2.2.2 Assoziationsstudie nach Einteilung der Patienten in Typ I und Typ II nach Cloninger	93
4.2.2.3 Assoziationsstudie nach der Bildung von "kombinierten Genotypen"	94
4.2.3 Assoziation von Polymorphismen des dopaminergen Systems mit Persönlichkeitsmerkmalen	94
4.3 Perspektiven	96
5 ZUSAMMENFASSUNG	97
6 LITERATURVERZEICHNIS	106
7 ANHANG	I
7.1 Vergleichssequenz D ₁	I
7.2 Vergleichssequenz D ₂	IV
7.3 Die Fragen zur Einteilung alkoholabhängigen Patienten in Typ I und Typ II	VII
7.3.1 Charakteristika für Typ I	VII
7.3.2 Charakteristika für Typ II	VII

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
ACTH	adrenokortikotropes Hormon
ADHD	<i>attention deficit hyperactivity disorder</i>
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
AP-1	Aktivator Protein-1 (Transkriptionsfaktor)
AS	Aminosäure
BalI	Restriktionsenzym aus <i>Brevibacterium albidum</i>
bp	Basenpaar(e)
BSA	<i>bovin serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
Bsp1286I	Restriktionsenzym aus <i>Bacillus sphaericus</i> (IAM 1286)
Bst NI	Restriktionsenzym aus <i>Bacillus stearothermophilus</i>
C	Cytosin
cAMP	zyklisches AMP
CRH	Cortikotropin Releasinghormon
DAT1	Dopamintransporter (gen) 1
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	desoxy-Nukleotide
DOPAC	3,4-Dihydroxyphenylethylamin
D ₁₋₅ -Rezeptor	Dopaminrezeptor D ₁₋₅
DTT	Dithiotreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
G	Guanin
GABA	Gamma-aminobuttersäure
GHRH	<i>Growth-hormone-releasing-hormone</i>
GHIH	<i>Growth-hormone-inhibiting-hormone</i>
h	Stunde(n)
kb	Kilobasenpaare
kg	Kilogramm
l	Liter
L-Dopa	L-Dihydroxyphenylalanin
M	Molar
Mae III	Restriktionsenzym aus <i>Methanococcus aeolicus</i> PL-15/H
min	Minute
M-MLV	Murine-Moloney Leukemia Virus
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MscI	Restriktionsenzym aus <i>Micrococcus species</i>

MspI	Restriktionsenzym aus <i>Moraxella species</i>
NlaIII	Restriktionsenzym aus <i>Neisseria lactamica</i>
ng	Nanogramm
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PRL	Prolaktin
Pwo	Polymerase aus <i>Pyrococcus woesei</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNase	<i>ribonuclease</i>
RNasin	RNase Inhibitor
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
s/sec	Sekunde
Sp1	Sp-1 Bindeprotein
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Taq	Polymerase aus <i>Thermophilus aquaticus</i>
Taq ^α I	Restriktionsenzym aus <i>Thermophilus aquaticus</i> (modifiziert)
TCI	Temperament- und Charakter-Inventar
TH	Tyrosinhydroxylase (gen)
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer für Elektrophorese
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	<i>units</i> (Enzymeinheit)
μl	Mikroliter
Upm	Umdrehungen pro Minute
3'UTR	3' untranslatierte Region
5'UTR	5' untranslatierte Region
UV	ultraviolettes Licht
VNTR	<i>variable number of tandem repeats</i> (Polymorphismus)
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

1.1 Der Neurotransmitter Dopamin

Die Erregungsübertragung im Nervensystem erfolgt bei den meisten Synapsen über einen Neurotransmitter, der aus den präsynaptischen Nervenendigungen in den synaptischen Spalt freigesetzt wird. Die Bindung des Transmitters an Rezeptoren der postsynaptischen Membran führt dann zur Öffnung von Ionenkanälen oder zur Aktivierung von rezeptorgekoppelten G-Proteinen. Ein solcher Neurotransmitter ist Dopamin. Zusammen mit Adrenalin und Noradrenalin wird er aufgrund seiner chemischen Struktur zu den Katecholaminen gezählt, die in den Neuronenendigungen und der Nebenniere aus Tyrosin synthetisiert werden. Der erste, geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Synthese ist die Hydroxylierung von Tyrosin zu 3,4-Dihydroxyphenylalanin (Dopa), der von dem Schrittmacherenzym Tyrosinhydroxylase katalysiert wird. Daran schließt sich eine Decarboxylierung zu 3,4-Dihydroxyphenylethylamin (Dopamin) an. In noradrenergen Neuronen und im Nebennierenrindemark wird Dopamin zu Noradrenalin hydroxyliert. Die Methylierung von Noradrenalin führt schließlich in adrenergen Neuronen und im Nebennierenmark zur Bildung von Adrenalin. In den Nervenendigungen werden die Transmitter in hoher Konzentration gespeichert, um zur Übertragung eines Nervenimpulses in den synaptischen Spalt ausgeschüttet zu werden. Inaktiviert wird Dopamin über den Dopamintransporter, der es aus dem synaptischen Spalt entfernt, und über den enzymatischen Abbau durch die Monoaminoxidase und die Catechol-O-Methyltransferase. Die dabei entstehenden Hauptmetaboliten sind Homovanilinsäure und in geringerer Menge 3,4-Dihydroxyphenylethylsäure (DOPAC).

Dopamin ist im Zentralnervensystem (ZNS) der Neurotransmitter einer Gruppe von Neuronen, deren Gesamtheit als dopaminerges System des ZNS bezeichnet wird. Dopamin kommt als Transmitter an zentralen Synapsen der Basalganglien, des limbischen Systems sowie der Hypophyse vor. Es ist an so unterschiedlichen Prozessen wie Willkürmotorik, psychischen Abläufen und neuroendokrinen Funktionen des Hypophysenvorderlappens beteiligt. Das Fehlen oder der Überschuss von Dopamin im synaptischen Spalt führt zu Störungen in der Erregungsfortleitung. Eine Akkumulation von Dopamin erzeugt sowohl im Tier als auch beim Menschen motorische Unruhe und Stereotypen. Eine Verarmung an Dopamin hat ebenfalls motorische Störungen zur Folge, wie sie beispielsweise bei Parkinsonsyndromen beobachtet werden. Eine Modulation der Dopaminwirkung über die Blockade oder die Aktivierung von Dopaminrezeptoren ist ein wichtiger pharmakotherapeutischer Angriffspunkt bei Erkrankungen wie Schizophrenie oder Parkinsonsyndromen.

1.2 Die Dopaminrezeptoren

1.2.1 Funktion und Vorkommen von Dopaminrezeptoren

Die Dopaminrezeptoren gehören zur großen Familie der membranständigen Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen als Motivmuster. Sie vermitteln die Effekte von Dopamin und setzen sie über die nachgeschalteten Signalkaskaden in aktivierender oder inhibierender Weise um. Bis heute sind fünf Dopaminrezeptorsubtypen bekannt, die in die Klassen der D₁-artigen und D₂-artigen Rezeptoren eingeteilt werden (Kebabian & Calne 1979, Sibley & Monsma 1992, Gingrich & Caron 1993). Zu den D₁-artigen Rezeptoren gehören die Subtypen D₁ und D₅ (Dearry et al., 1990; Sunahara et al., 1990; Zhou et al., 1990), zu den D₂-artigen Rezeptoren die Subtypen D₂, D₃, und D₄ (Bunzow et al., 1988; Sokoloff et al., 1990; van Tol et al., 1991). Die D₁-artigen Rezeptoren stimulieren über ein G_S-Protein die Adenylatzyklase, während D₂-artige Rezeptoren über ein G_I-Protein entweder inhibitorisch an die Adenylatzyklase gekoppelt sind oder über andere Signaltransduktionsmechanismen wie die Phosphoinositoltriphosphat-Kaskade wirken. Die G-Proteine leiten dann die Wirkung der Rezeptorliganden an die *second-messenger* Systeme weiter.

Die Verteilung der Dopaminrezeptorsubtypen im ZNS ist bei Mensch und Ratte ähnlich. Sowohl beim Menschen als auch bei der Ratte kommt der D₂-Rezeptorsubtyp am häufigsten vor und ist beim Menschen im Striatum, im Nucleus accumbens und in der Substantia nigra und in geringerem Ausmaß im Kortex vorhanden. Bei der Ratte kommt er im Kortex in größerer Anzahl vor als beim Menschen (Gandelmann et al., 1991). Eine ähnliche Verteilung wie der D₂-Rezeptor hat auch der D₁-Rezeptor, nur ist dieser beim Menschen im Kortex in größerer Menge nachweisbar. D₃-Rezeptoren finden sich in beiden Spezies vor allem im Nucleus accumbens, in der Substantia nigra und in limbischen Hirnarealen. D₄-Rezeptoren sind weniger häufig als beispielsweise D₂-Rezeptoren und wurden im frontalen Kortex, im Bereich der Amygdala und im Mittelhirn nachgewiesen. Der D₅-Rezeptorsubtyp ist vorrangig im frontalen Kortex, Striatum, Hippokampus und Hypothalamus lokalisiert.

1.2.2 Die Gene der Dopaminrezeptoren

Die Gene der Dopaminrezeptoren werden von ihrer Genstruktur her wie die Dopaminrezeptoren in die D₁-artigen Rezeptoren und die D₂-artigen Rezeptoren eingeteilt. Die Gene der fünf Subtypen weisen alle eine GC-reiche Promotorregion auf und besitzen untereinander eine relativ hohe Homologie in ihren Transmembrandomänen. Die Homologie ist dabei zwischen den D₁-artigen Rezeptoren mit ca. 78 % höher, wohingegen die Homologie zwischen den D₂-artigen Rezeptoren mit 75 % - 53 % gering ist (Gingrich & Caron, 1993). Der Hauptunterschied zwischen den zwei Rezeptorgruppen auf Genebene ist das Vor-

kommen von Introns. D₁-artige Rezeptoren besitzen keine Introns, während D₂-artige Rezeptoren über drei bis sieben Introns verfügen. Für die Dopaminrezeptorgene existieren auch einige Spleißvarianten, die sowohl beim Menschen als auch bei der Ratte vorkommen. Für den am häufigsten vorkommenden D₂-Rezeptor sind zwei Isoformen beschrieben, die durch alternatives Spleißen entstehen (Monsma et al., 1989; Dal Toso et al., 1989; Giros et al., 1989). Beim Menschen werden sie mit D_{2L} und D_{2S} bezeichnet, für die Ratte mit D_{2A} und D_{2B}. Beide Isoformen kommen miteinander im Gehirn vor, wobei die lange Isoform D_{2L} (D_{2A}) vorrangig in den Zielarealen dopaminerger Fasern zu finden ist und dort vermutlich für postsynaptische Rezeptoren kodiert. Die kurze Isoform D_{2S} (D_{2B}) ist dagegen vermehrt in den Axonen von dopaminergen Zellgruppen im Mesencephalon und im Hypothalamus lokalisiert und kodiert wahrscheinlich für Autorezeptoren (Kahn et al., 1998). Für den D₃-Rezeptorsubtyp sind zwei Varianten beschrieben, von denen es sich bei der einen um eine Insertion in der ersten extrazellulären Schleife und bei der anderen um eine Deletion in der dritten intrazellulären Schleife handelt (Pagliusi et al., 1993; Fishburn et al., 1993). Diesen Spleißvarianten des D₃-Rezeptors konnten bisher keine relevanten Funktionen zugeordnet werden. Für die Dopaminrezeptorsubtypen D₁, D₄ und D₅ sind bisher keine Isoformen beschrieben.

Tab. 1: Übersicht über die Struktur, Charakteristika und Kopplung der klonierten Dopaminrezeptorsubtypen beim Menschen

Die Angaben wurden aus der Literatur von Gingrich und Caron (1993), Griffon und Mitarbeiter (1996), Garris und Mitarbeitern (1999) zusammengestellt. Die Pfeile zeigen die Aktivierung (↑) bzw. die Inhibierung (↓) der Adenylatzyklase an. Als Maß für die Größe der Proteine ist die Anzahl der Aminosäuren (AS) angegeben.

Rezeptor	Second-messenger	Exons/ Introns	Größe des Proteins (AS)	Chromosom (Lokalisation)	andere Spezies (kloniert)
D ₁ -	AC↑	1/ 0	446	5p35.1	Ratte, Maus
D ₅ -	AC↑	1/ 0	475/ 477	4p15.1-16.1	Ratte, Maus
D ₂ -	AC↓, IP ₃ , K ⁺	6/ 5 7/ 6	415 für D _{2S} 444 für D _{2L}	11q22-23	Ratte, Rind, Xenopus laevis
D ₃ -	AC↓, IP ₃	6/ 5 5 (4)/ 4 (3)	400 379 (351)	3q13.3	Ratte, Maus, Fisch
D ₄ -	AC↓, IP ₃	4/ 5	387	11p15.5	Ratte

1.2.3 Polymorphismen der Dopaminrezeptorgene

Zur Zeit sind für alle Dopaminrezeptorgene mindestens zwei Polymorphismen bekannt. Einige wurden bei der Sequenzanalyse der Gene entdeckt und dienten dann als genetische Marker¹ für die Kartierung der Gene in die entsprechende Chromosomenregion, beispielsweise für die Lokalisierung des D₁-Rezeptorgens (Grandy et al., 1990). Andere wurden für Untersuchungen wie Kopplungsanalysen² und Verwandtschaftsanalysen identifiziert. Traditionell wird die Variabilität alleler Sequenzen als DNA-Polymorphismus bezeichnet, wenn es in einer menschlichen Population für einen Locus mehr als eine Variante (Allel) gibt, die (das) mit einer Häufigkeit von über 1 % auftritt. Die häufigsten polymorphen Positionen sind einzelne Basensubstitutionen (Transitionen³ oder Transversionen⁴), die in den Introns oder den untranslatierten Regionen der Gene vorzufinden sind. Insertions- und Deletionsmutationen treten ebenfalls in nichtcodierender DNA sehr häufig auf, jedoch selten in codierender DNA, wo aufgrund des Selektionsdruckes die Anzahl der überlebenden Mutationen, die zu Verschiebungen des Leserasters führen, gering gehalten wird. Mittlerweile werden Polymorphismen häufig für Assoziationsuntersuchungen⁵ (vgl. 1.5.4) zur Identifizierung von Anfälligkeitsloci⁶ für bestimmte Krankheiten verwendet. Beispielsweise wurde eine Assoziation des Exon III Polymorphismus des D₄-Rezeptorgens mit der Erkrankung *attention deficit hyperactivity disorder* (ADHD) beschrieben (La Hoste et al., 1994). Eine zweite Studie bestätigte das Ergebnis (chi-quadrat = 4.65, p < 0.035) für die Assoziation des D₄-Rezeptorgens mit der ADHD (Swanson et al., 1998). Andere Gene des dopaminergen Systems, wie das Dopamintransportergen und die Dopamin-β-Hydroxylase konnten mit Hilfe von Polymorphismen ebenfalls mit der Erkrankung ADHD assoziiert werden (Daly et al., 1999).

Unter den Dopaminrezeptorpolymorphismen fand der TaqI A Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLP) in der 3' untranslatierten Region (3'UTR) des D₂-Rezeptorgens am meisten Beachtung, da mit diesem Polymorphismus eine Assoziation mit der Alkoholabhängigkeit berichtet wurde (Blum et al., 1990). Seit diesem Befund wird die Assoziation des D₂-Rezeptorgens mit Alkoholismus allerdings kontrovers diskutiert und konnte bisher weder eindeutig bestätigt noch eindeutig widerlegt werden. In der neusten Literatur wurde beispielsweise von Gelernter und Kranzler (1999) keine Assoziation zwischen dem TaqI A Polymorphismus und Alkoholismus gefunden, während von Noble und Mitarbeitern (1998) eine Assoziation mit dem Polymorphismus und der Alkoholabhängigkeit beobachtet wurde. Mittlerweile sind für das D₂-Rezeptorgen noch 15 weitere Polymorphismen bekannt, von

¹ Ein genetischer Marker ist eine polymorphe DNA oder eine Proteinsequenz, die von einem einzigen chromosomalen Locus abstammen und für die genetische Kartierung benutzt werden.

² Kopplung ist die Tendenz von Genen oder anderen DNA-Sequenzen an bestimmten Loci, aufgrund ihrer räumlichen Nähe auf einem Chromosom zusammen vererbt zu werden.

³ Austausch einer Purinbase durch eine Purinbase bzw. einer Pyrimidinbase durch eine Pyrimidinbase

⁴ Austausch einer Purinbase durch eine Pyrimidinbase bzw. einer Pyrimidinbase durch eine Purinbase

⁵ Bei Assoziationsuntersuchungen handelt es sich um statistische Verfahren zum Nachweis alleler Assoziation zwischen einer Erkrankung und dem Auftreten eines bestimmten Allels, was zur Identifizierung von Anfälligkeitsloci führen kann.

⁶ Anfälligkeitsloci sind bestimmte Orte auf den Chromosomen, die die Position eines Gens für die Anfälligkeit einer Erkrankung bestimmen.

denen der Ser311Cys-Polymorphismus (Itokawa et al., 1993) aufgrund des Aminosäureaustauschs nach dem TaqI A RFLP am häufigsten für Untersuchungen verwendet wurde. Neben den Polymorphismen des D₂-Rezeptorgens wurde der Exon III Polymorphismus (48bp repeat) des D₄-Rezeptorgens am häufigsten untersucht, da er aus einer variablen Anzahl von Wiederholungsabschnitten im dritten Exon im Bereich der G-Proteinbindungsstelle besteht. Zusätzlich weist er eine unterschiedliche Verteilung in der Bevölkerung auf (Chang et al., 1996) und bindet das atypische Neuroleptikum Clozapin stärker als die anderen Dopaminrezeptorsubtypen (van Tol et al., 1992). Aufgrund dieser Charakteristika wurde der Exon III Polymorphismus für viele Assoziationsstudien, vor allem bei Erkrankungen des dopaminergen Systems verwendet. Die Befunde aus diesen Studien werden allerdings wie die Befunde für die Polymorphismen des D₂-Rezeptorgens bis heute kontrovers diskutiert (Sander et al., 1997; Swanson et al., 1998).

Ein weiterer Polymorphismus, der im Zusammenhang mit dem dopaminergen System häufig untersucht wurde, ist der BalI (MscI) Polymorphismus im ersten Exon des D₃-Rezeptorgens. Dieser Polymorphismus führt zu einem Aminosäureaustausch von Serin zu Glycin im Rezeptorprotein und wurde vor allem im Zusammenhang mit Schizophrenie untersucht. Die D₁-artigen Rezeptoren, D₁ und D₅, wurden, da sie bisher nicht für eine bestimmte pharmakologische Wirkung verantwortlich gemacht werden konnten, selten untersucht. Im Zusammenhang mit Alkoholismus wurden einige Assoziationsstudien mit zwei Polymorphismen des D₁-Rezeptorgens durchgeführt, weil man mittlerweile von einer Beteiligung des dopaminergen Systems bei der Erkrankung ausgeht (Heinz et al., 1996; Comings et al., 1997).

1.3 Die Tyrosinhydroxylase und der Dopamintransporter - zwei wichtige Proteine im dopaminergen System

Bei der Tyrosinhydroxylase handelt es sich um das Schrittmacherenzym der Dopaminsynthese (vgl. 1.1), die als Monooxygenase (Tyrosin-3-Monooxygenase) L-Tyrosin in L-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) umwandelt. Ihre Aktivität kann intrazellulär allosterisch durch Dopamin und extrazellulär durch dopaminerge Autorezeptoren und die cAMP-Kaskade reguliert werden. Die Tyrosinhydroxylase kommt in den dopaminergen Neuronen, in den synaptischen Endigungen und im Neuronensoma vor.

Ein zweites wichtiges Protein des dopaminergen Systems stellt der Dopamintransporter dar. Sobald Dopamin in den synaptischen Spalt ausgeschüttet wird, wird es vom Dopamintransporter in die Nervenendigungen zurücktransportiert und damit aus dem synaptischen Spalt entfernt. Anschließend wird Dopamin intra- oder extraneural durch die Monoaminoxidase oder die Catechol-O-Methyltransferase abgebaut. Der Dopamintransporter

kommt in allen dopaminergen Neuronen des ZNS vor und gehört zu einer Familie von Transportproteinen, die zwölf Transmembranhelices besitzen. Störungen in der Funktion des Transporters führen zu einem erhöhten Dopamingehalt im synaptischen Spalt, wodurch es zu Unruhe und Erregtheit kommt. Einige Formen von Parkinson, das Tourette-Syndrom und die *attention deficit hyperactivity disorder* (ADHD) werden mit einer Fehlfunktion des Dopamintransporters in Zusammenhang gebracht (Comings et al., 1996; Faraone et al., 1998; Ouchi et al., 1999; Ichise et al., 1999). Von den Suchtmitteln ist bekannt, daß Kokain den Transporter hemmt und zu einem erhöhten Dopamingehalt im synaptischen Spalt führt, was Euphorie und Konzentrationssteigerung hervorruft (Benkert & Hippus, 1996).

Die Charakterisierung der Gene der beiden Proteine führte wie bei den Dopaminrezeptoren zur Identifizierung von Polymorphismen, die mittlerweile für Assoziationsuntersuchungen genutzt werden. Für das TH-Gen sind bis heute 13 Polymorphismen bekannt, von denen einer im ersten Intron des Gens am häufigsten untersucht wurde (Seretti et al., 1998). Für den Dopamintransporter wurden bisher vier Polymorphismen beschrieben. Wegen seiner genetischen Variabilität wurde der 40 bp VNTR (*variable number of tandem repeat*) am häufigsten untersucht und weist beispielsweise wie auch der Exon III Polymorphismus des D₄-Rezeptors eine Assoziation mit der Erkrankung ADHD (Cook et al., 1995; Gill et al., 1997; Waldman et al., 1998) und eine Assoziation mit der Alkoholabhängigkeit auf, wenn sie mit starken Entzugerscheinungen einhergeht (Sander et al., 1997; Schmidt et al., 1998).

1.4 Erkrankungen mit Beteiligung des dopaminergen Systems

Das dopaminerge System wird schon lange mit einigen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Für die Schizophrenie, bei einigen Parkinsonsyndromen und auch für die Chorea Huntington ist eine Beteiligung des dopaminergen Systems nachgewiesen worden (Seeman et al., 1989; Cha et al., 1998).

Für die Schizophrenie gibt es seit langem die Dopaminhypothese. Sie beruht auf Beobachtungen, daß Substanzen, die Dopaminrezeptoren blockieren, antipsychotisch wirken und daß Substanzen, die die dopaminerge Aktivität stimulieren, in hohen Dosen Symptome ähnlich der Schizophrenie hervorrufen können. Allerdings konnten Störungen im dopaminergen Systems als Ursache für das Auftreten einer Schizophrenie noch nicht sicher nachgewiesen werden (Mohn et al., 1999). Auch für die Depression wird unter anderem eine Störung im dopaminergen System vermutet. Die Erkrankungen, die am häufigsten mit Dopamin in Verbindung gebracht werden, sind verschiedene Parkinsonsyndrome. Für diese Erkrankung konnte gezeigt werden, daß ein bestimmter Bereich des dopaminergen Bahnsystems, vor allem nigrostriatale Bahnen, degeneriert ist, wodurch es zu einem

Dopaminmangel kommt. Das führt zu den typischen Bewegungsstörungen, denen durch Gabe der Dopaminsynthesevorstufe L-DOPA und neuerdings unterstützend durch Dopaminagonisten entgegengewirkt werden kann.

Bei Abhängigkeitserkrankungen werden seit einiger Zeit Störungen der dopaminergen Neurotransmission postuliert (Wise et al., 1988). Die Beteiligung des dopaminergen System wird in Form eines "Belohnungssystem" diskutiert, das für die Vermittlung der angenehmen und unangenehmen Gefühle beim Suchtmittelgebrauch verantwortlich ist. Das dopaminerge Verstärkungssystem wird dabei als ein System definiert, das durch "primäre Verstärker" wie Essen oder Trinken angesprochen wird. Man nimmt bei Abhängigkeitserkrankungen eine dopaminerge Dysfunktion an, die entweder genetisch determiniert ist und zur verminderten Dopaminfreisetzung führt (Cloninger et al., 1987a, b) oder die durch den chronischen Suchtmittelgebrauch hervorgerufen wird (Balldin et al., 1992; Imperato et al., 1986). Unbestritten ist, daß dem dopaminergen System eine zentrale Rolle bei der Verhaltensverstärkung durch Belohnung zukommt (Di Chiara, 1995).

1.4.1 Alkoholabhängigkeit

Von den Mißbrauchs- und Abhängigkeitserkrankungen ist die Erkrankung Alkoholabhängigkeit am weitesten verbreitet. Für die Alkoholabhängigkeit ist erwiesen, daß sie genetisch determiniert ist und daß das dopaminerge Belohnungssystem eine Rolle bei der Ätiologie der Erkrankung spielt. Die Tendenz, daß Kinder dieselben Trinkmuster aufweisen wie ihre Eltern wurde schon in der Antike beobachtet (Plato und Aristoteles (Warner und Rosett, 1975)). Alkoholismus wurde von Goodwin und Mitarbeitern (1976) als eine multifaktorielle, genetisch beeinflusste Krankheit beschrieben, deren genetische Ursache durch mehrere Studien nachgewiesen wurde. Diese Untersuchungen konnten zeigen, daß erstens ein 25% bis 50% Risiko für die Entwicklung einer Alkoholabhängigkeit bei Söhnen und Brüdern von schwer alkoholabhängigen Männern besteht (Pickens et al., 1991), zweitens daß Alkoholpräferenz selektiv bei Tieren gezüchtet werden kann (Li et al., 1981), zum dritten, daß eine 55% oder höhere Konkordanzrate bei monozygoten Zwillingen besteht gegenüber einer Rate von nur 28% für gleichgeschlechtliche dizygote Zwillinge (McGue et al., 1992; Pickens et al., 1991) und viertens, daß es unter Halbbrüdern mit verschiedenen Vätern und adoptierten Söhnen von alkoholabhängigen Männern eine höhere Rate an Alkoholabhängigen gibt, ähnlich der Rate, die unter den biologischen Vätern vorhanden ist (Sigvardsson et al., 1994).

Als biochemische Basis der Alkoholabhängigkeit wird ein Unterschied im Metabolismus des Gehirns diskutiert, wobei Dopamin ein wichtiger Transmitter für die Vermittlung der angenehmen Gefühle in Zusammenhang mit dem Trinken darstellt. Sicher ist bisher, daß Etha-

nol kurzzeitig die Feuerrate von dopaminergen Neuronen erhöht (Gessa et al., 1985) und daß es nach Absetzen von Ethanol nach längerem Gebrauch zu einer verminderten Aktivität dopaminergener Neurone kommt (Rosetti et al., 1992). Aufgrund dieser Befunde wird vermutet, daß Ethanol zur Stimulation dopaminergener Neurone im Belohnungssystem führt, und es so zu angenehmen Gefühlen kommt. Wird Ethanol abgesetzt kommt es zu einer verminderten Aktivität der dopaminergen Neurone, was durch die Adaptation der Neurone an die höhere Dopaminmenge erklärt wird, wodurch die Neurone demzufolge weniger Dopamin freisetzen. Die verminderte Dopaminmenge führt daraufhin zu unangenehmen Gefühlen und unterstützt die erneute Einnahme von Ethanol. Diese Prozesse halten allerdings nicht lange an, so daß das dopaminerge System nur in geringem Maße für die Aufrechterhaltung von Abhängigkeit selbst verantwortlich gemacht wird.

Der genetische Einfluß wurde nicht nur wie erwähnt in Zwillings- und Adoptionsstudien gezeigt, sondern auch anhand psychologischer Untersuchungen von Patienten. Cloninger (1987b) identifizierte in seinen psychobiologischen Studien zwei vererbare Typen von Alkoholabhängigkeit. Der Typ I beginnt seinen Alkoholmißbrauch nach dem Alter von 25 Jahren und zeigt eine schwere psychische Abhängigkeit. Der Typ II beginnt seinen Alkoholmißbrauch vor dem Alter von 25 Jahren und ist durch sein Unvermögen gekennzeichnet, abstinent zu bleiben und zeigt aggressives und antisoziales Verhalten. Der Typ I wird bei Männern und Frauen gefunden und ist nicht so stark erblich bedingt wie der Typ II, der fast nur bei Männern auftritt. Cloninger ging dabei von seinem biologisch psychosozialen Persönlichkeitsmodell aus und verwendete dazu auch sein Temperaments- und Charakterinventar (TCI) (vgl. 1.5.3).

Schließlich wurden bei Analysen zur Identifizierung von Kandidatengenomen zwei Genorte gefunden, die ein Kopplungsungleichgewicht⁷ zeigten. Der erste Bereich liegt im Gencluster für die GABA-Rezeptoren (Gammaaminobuttersäure) auf Chromosom 4 (Buck et al., 1997; Long et al., 1998), der zweite identifizierte Bereich liegt auf Chromosom 11 in der Region, in der das Gen für den Dopaminrezeptor D₄ lokalisiert wurde (Long et al., 1998). Die statistischen Werte für eine Kopplung liegen nicht hoch, so daß weiterhin mit Hilfe von Kopplungsanalysen oder über Assoziationsstudien nach Kandidatengenomen gesucht wird, die für Alkoholismus verantwortlich sein könnten.

1.5 Möglichkeiten zur Untersuchung von krankheitsassoziierten Veränderungen im dopaminergen System

Um krankheitsassoziierte Veränderungen im dopaminergen System zu untersuchen, bieten sich mehrere Möglichkeiten an. Das mit einer Krankheit assoziierte Verhalten kann im Tiermodell, mit Hilfe von pharmakologischen Tests oder mit psychologischen Tests am

⁷ Kopplungsungleichgewicht: nichtzufällige Kombination von Allelen an Genorten, die gemeinsam miteinander vererbt werden.

Menschen untersucht werden. Zudem können Erkenntnisse über krankheitsassoziierte Veränderungen auf genetischer oder neuroendokriner Basis bei Tier und Mensch gewonnen werden. Im folgenden werden die Möglichkeiten vorgestellt, die in dieser Arbeit zur Untersuchung des dopaminergen Systems verwendet wurden.

1.5.1 Verhaltensuntersuchungen am Tier

Verhaltensmodelle lassen sich in drei Kategorien einordnen, je nach der Aussage, die mit den Ergebnissen getroffen werden kann. Sie können zum einen die Funktionsweise bestimmter Areale oder Systeme des Gehirns darstellen und dazu dienen, die Mechanismen, die für Veränderungen im Gehirn verantwortlich sind, zu erklären. Zum anderen werden sie für die Entwicklung neuer Medikamente genutzt, wobei neue Kandidatensubstanzen im Tierexperiment mit der Wirkung etablierter Substanzen verglichen werden. Zum dritten versucht man, mit Hilfe von Verhaltensmodellen krankheitsbedingtes Verhalten zu simulieren und somit ein Modell für die Untersuchung des krankhaften Verhaltens zu haben oder Substanzen zu testen, die das Verhalten verändern oder verbessern.

Das von Havemann und Mitarbeitern (1986) entwickelte Tiermodell gehört zu der ersten Kategorie von Modellen. Dabei wird nach einer einmaligen Applikation von 2 mg/kg des Dopaminagonisten Apomorphin das Verhalten von Ratten im *open field* getestet. Die Tiere zeigen im *open field* bei dieser Dosis Apomorphin individuell unterschiedliches Verhalten, was vermutlich auf eine spezifische Rezeptoraktivierung zurückzuführen ist und auf individuelle Unterschiede im dopaminergen System insbesondere der Dopaminrezeptoren hinweist. Dieses Verhaltensmodell kann daher zur Untersuchung von individuellen Unterschieden im dopaminergen System genutzt werden, wie sie beispielsweise bei der Alkoholabhängigkeit diskutiert werden.

In dem Verhaltensmodell von Havemann und Mitarbeitern lassen sich aufgrund von Stereotypen, die über die Aktivierung der Dopaminrezeptoren durch Apomorphin hervorgerufen werden, zwei Verhaltensweisen eindeutig unterscheiden. Die eine Gruppe von Tieren zeigt als Stereotypie ein anhaltendes Schnüffeln, das mit einer Erhöhung der lokomotorischen Aktivität einhergeht und die Tiere der Theorie nach als vorherrschend "mesolimbisch aktive Tiere" kennzeichnet. Die andere Gruppe der Tiere weist als Stereotypie ein ständiges Nagen auf, das die Tiere als vorrangig "nigrostriatal aktive Tiere" charakterisiert. Sie werden nach ihrer vorherrschend gezeigten Stereotypie als "Schnüffler" und "Nager" bezeichnet. Die lokomotorische Aktivität der "Nager" ist dabei im Vergleich zu Kontrolltieren erhöht, sie ist aber geringer als bei den "Schnüfflern" (vgl. Abb. 1a, 1b).

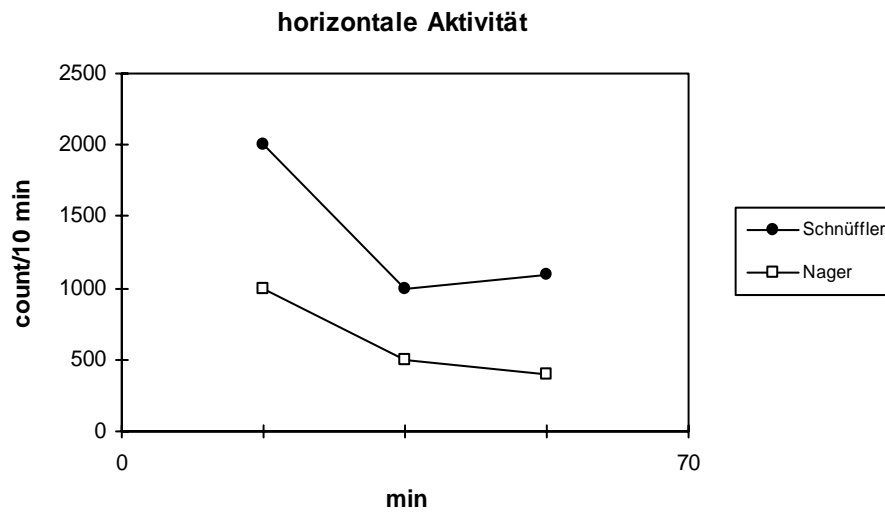


Abb. 1a: Beispiel für die phänotypisch unterschiedliche horizontale Aktivität von "Schnüfflern" und "Nagern"

Die horizontale Aktivität gemessen in der Testanordnung ist dabei ein allgemeiner Parameter für die lokomotorische plus der durch die stereotypen Bewegungen hervorgerufene Aktivität der Ratten (nach Surmann und Havemann-Reinecke, 1995).

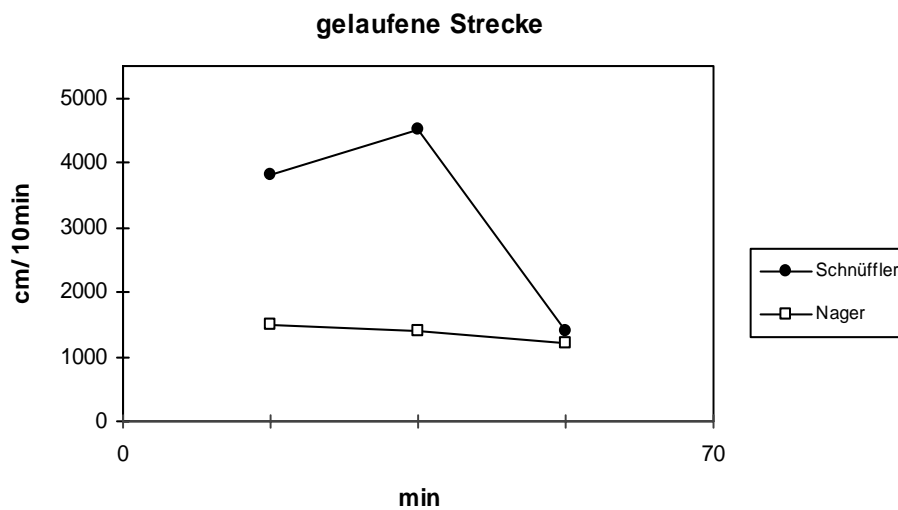


Abb. 1b: Beispiel für die phänotypisch unterschiedliche zurückgelegte Gesamtstrecke (totale Distanz) von "Schnüfflern" und "Nagern"

Die totale Distanz gibt die gesamte Laufstrecke wieder, die die Tiere in der *open field* Testanordnung zurücklegen und dient als Maß für die rein lokomotorische Aktivität der Tiere (nach Surmann und Havemann-Reinecke, 1995).

Der Dopaminrezeptoragonist Apomorphin, durch den die Verhaltensweisen ausgelöst werden, bindet mit hoher Affinität an D₁- und D₂-Rezeptoren und mit etwas geringerer Affinität an D₃-Rezeptoren (Seeman und van Tol, 1994). Die Bindung von Apomorphin an D₁- und D₂-Rezeptoren und die dadurch hervorgerufenen deutlichen Unterschiede im Verhalten führten zu der Hypothese, daß die Tiere sich nicht nur phänotypisch sondern auch von der genetischen Struktur ihrer Dopaminrezeptoren unterscheiden könnten.

1.5.2 Der Apomorphintest bei Patienten

Der Apomorphintest (*Apomorphin challenge test*) ist beim Menschen eine Methode zur Testung der Reagibilität des dopaminergen System *in vivo*. Dabei wird auf dem Umweg über das Hypophysen-Hypothalamussystem Sensitivität und Reaktion dopaminerger Rezeptoren getestet (Lal, 1988). Für Erkrankungen, bei denen Veränderungen im dopaminergen System vermutet werden, wie beispielsweise bei Alkoholismus, kann aufgrund des Tests eine qualitative Aussage über die Sensitivität von Dopaminrezeptoren gemacht werden. Durch die einmalige Applikation von Apomorphin werden die Hormone Cortisol und das Wachstumshormon (Somatotropin, GH) vermehrt ausgeschüttet. Bei Prolaktin (PRL)

sorgt Apomorphin dagegen für einen Abfall im Hormonspiegel. Die apomorphininduzierten Veränderungen der Hormonspiegel erfolgen beim Menschen wahrscheinlich durch Stimulation postsynaptischer hypothalamischer (GH, ACTH) bzw. hypophysärer (PRL) D₂-Rezeptoren (Rosetti et al., 1992; Balldin et al., 1992). In der Klinik wird dieser Test beispielsweise für die Diagnose einiger Parkinsonsyndrome verwendet, um zu testen, ob die Behandlung mit einem D₂-Agonisten sinnvoll ist. Meist wird er aber in der Forschung als in vivo Testmethode für die Sensitivität der D₂-Rezeptoren eingesetzt. In den folgenden Abbildungen 2a-c ist die Wirkung von Apomorphin auf die Sekretion der Hormone Somatotropin, Prolaktin und Cortisol schematisch dargestellt.

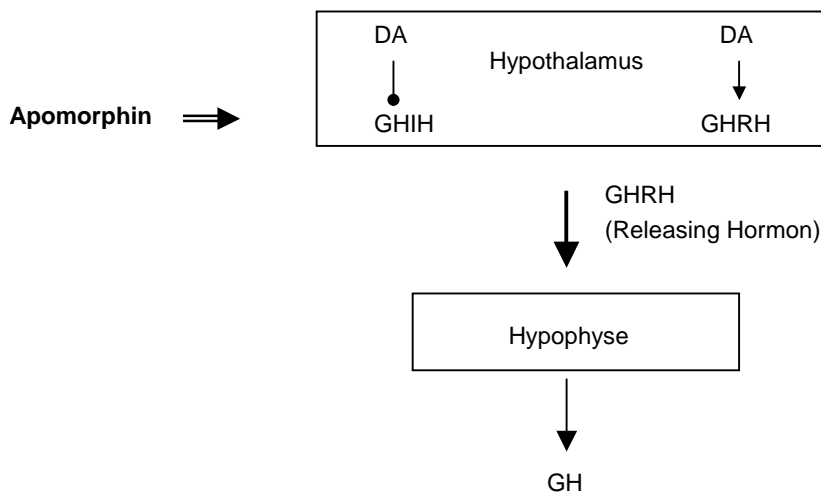


Abb. 2a: Wirkung von Apomorphin auf die Sekretion des Wachstumshormons

Apomorphin aktiviert über zentrale D₂-Rezeptoren die Freisetzung von *Growth-hormone-releasing-hormone* (GHRH) (↓) und inhibiert die Freisetzung von *Growth-hormone-inhibiting-hormone* (GHIH) (⊥) auf der Ebene des Hypothalamus. Bei der Wirkung von Apomorphin scheint der aktivierende Effekt auf GHRH zu dominieren. Dadurch wird die GH-Freisetzung aus der Hypophyse stimuliert.

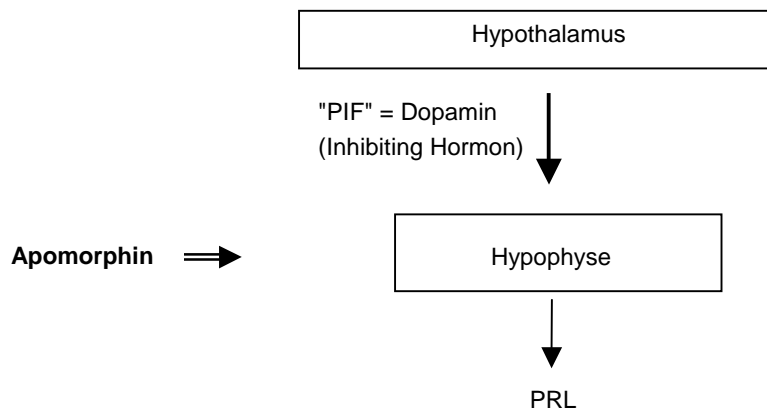


Abb. 2b: Wirkung von Apomorphin auf die Sekretion von Prolaktin

Apomorphin aktiviert D₂-Rezeptoren der Hypophyse und setzt Dopamin frei. Dopamin ist der wichtigste Prolaktin-Inhibiting-Faktor (PIF), der die Prolaktinfreisetzung aus der Hypophyse hemmt. Durch Apomorphin kommt es zur Verringerung der Prolaktinkonzentration.

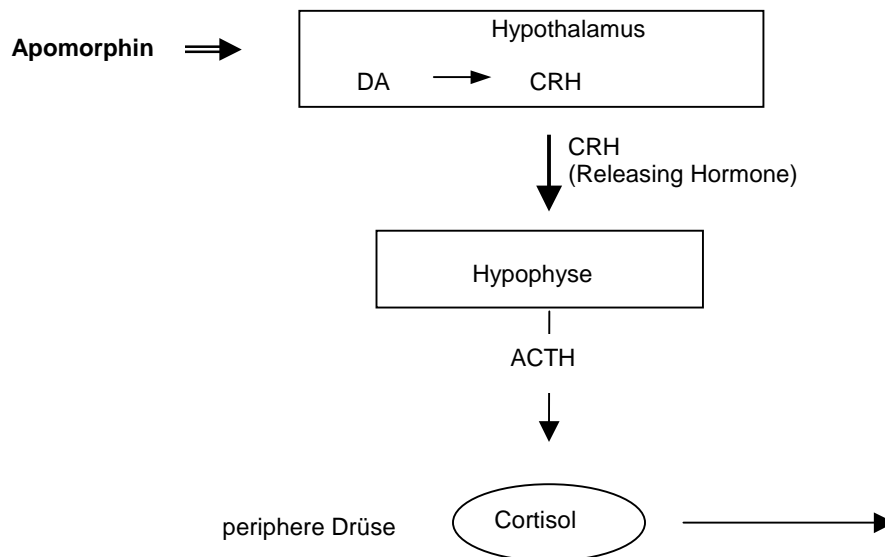


Abb. 2c: Wirkung von Apomorphin auf die Sekretion von Cortisol

Über die Aktivierung zentraler D₂-Rezeptoren durch Apomorphin wird das Corticotropin-Releasing-Homon (CRH) im Hypothalamus vermehrt freigesetzt. CRH aktiviert in der Hypophyse die Freisetzung von ACTH, das auf periphere cortisolproduzierende Drüsen (Nebennierenrinde) wirkt und diese zur Cortisolproduktion aktiviert.

1.5.3 Ein psychologisches Modell: das dimensionale Persönlichkeitsmodell von Cloninger

Zur Charakterisierung von Persönlichkeit werden in der Psychologie Modelle verwendet, mit deren Hilfe man Persönlichkeit und Abnormalitäten von Persönlichkeit beschreiben kann. Diesen Modellen liegt jeweils eine bestimmte Theorie zugrunde (Cloninger et al., 1987; McCrae & Costa, 1987; Tellegen et al., 1988). Die Erhebung der Daten zur Persönlichkeit erfolgt anhand von Fragebögen, die entweder von den Probanden selbst oder von einem trainierten Rater („Fragenden“) ausgefüllt werden.

Das von Cloninger entworfene dimensionale Persönlichkeitsmodell (1987a) stellt ein biologisch psychosoziales Modell für krankheitsassoziiertes abnormales Verhalten dar. Es versucht, mit Hilfe von vier Dimensionen die Ausprägung und Struktur von Temperament und Charakter zu erklären. Dabei haben neurobiologische, klinische und genetische Studien vier Dimensionen für das Temperament bestätigt, die als Neugierverhalten (*novelty seeking*), Schadensvermeidung (*harm avoidance*), Belohnungsabhängigkeit (*reward dependence*) und Beharrungsvermögen (*persistence*) bezeichnet werden (Cloninger et al., 1993). In dem Modell wurden diese vier unabhängigen Temperamentsdimensionen als überwiegend genetisch determiniert postuliert. Die einzelnen Persönlichkeitsdimensionen sind in der folgenden Tabelle genauer erklärt.

Tab. 2: Beschreibung von Eigenschaften, nach denen Personen den vier Temperamentsdimensionen nach dem Modell von Cloninger (1998) zugeordnet werden.

Temperamentsdimension	Charakterisierung der extremen Varianten des Temperaments		wichtigster Neuromodulator
	hoch	niedrig	
<i>novelty seeking</i> (Neugierverhalten)	explorativ, impulsiv; verschwenderisch, irritierbar	reserviert, streng, genügsam, stoisch	Dopamin
<i>harm avoidance</i> (Schadensvermeidung)	pessimistisch, ängstlich, gehemmt, leicht erschöpfbar	optimistisch, waghalsig, kontaktfreudig, energiegeladen	GABA und Serotonin
<i>reward dependence</i> (Belohnungsabhängigkeit)	sentimental, offen, gefühlbetont, sympathisch	kritisch, unnahbar, distanziert, unabhängig	Norepinephrin und Serotonin
<i>persistence</i> (Beharrungsvermögen)	fleißig, bestimmt, ambitioniert, perfektionistisch	faul, träge, enttäuschend, pragmatisch	Glutamat und Serotonin

Die drei Charakterdimensionen Selbstlenkungsfähigkeit (*self-directedness*), Kooperativität (*cooperativeness*) und Selbsttranszendenz (*self-transcendence*) des Modells werden in dieser Arbeit nicht näher erläutert, da sie nach der Theorie keine genetische Determinierung aufweisen und in dieser Arbeit nicht verwendet wurden.

Nach der neurobiologischen Theorie von Cloninger sind die einzelnen Temperamentsdimensionen mit katecholaminergen Systemen im Gehirn assoziiert (vgl. Tab. 2). *Novelty Seeking* soll negativ mit der mesolimbischen dopaminergen Aktivität korreliert sein (Ruegg et al., 1994), *Harm avoidance* wurde mit der Ausschüttung von Serotonin assoziiert (Ruegg et al., 1994) und für das noradrenerge System wurde in einer Untersuchung eine Korrelation mit der Dimension *reward dependence* nachgewiesen (George et al., 1996). Über *persistence* sind bisher wenige Ergebnisse bekannt, da die Dimension erst 1993 von Cloninger als unabhängig vererbt erklärt wurde.

In Cloningers Modell (Cloninger et al., 1987a) wurde betont, daß für die Beschreibung der Persönlichkeit einer Person nicht nur die einzelne Dimension, sondern vor allem das Zusammenspiel und die Ausprägung von verschiedenen Dimensionen relevant sind. Wird dann eine Kombination aus den vier Temperamentsfaktoren gebildet, so läßt sich je nach Ausprägung der einzelnen Dimensionen krankheitsassoziiertes Verhalten sehr präzise beschreiben, was für einen Einsatz dieser Charakterisierung bei genetischen Untersuchungen von großem Wert ist.

Die vier Temperamentsdimensionen *novelty seeking*, *harm avoidance*, *reward dependence* und *persistence* sind nach der Theorie zwischen 50%-65% genetisch determiniert und werden unabhängig voneinander vererbt. Daher ist es möglich, mit ihnen ein Profil der krankheitsbedingten Persönlichkeit zu definieren und nach Kopplung oder Assoziation mit den einzelnen Ausprägungen der Dimensionen oder dem Gesamtprofil zu suchen. Ein Beispiel aus der neueren Literatur ist eine Assoziation des Exon III Polymorphismus des Dopaminrezeptors D_4 mit dem Temperamentsfaktor *novelty seeking*. Bei gesunden Probanden zeigten sich erhöhte Werte von *novelty seeking*, die mit dem vermehrten Auftreten des 7er Allels des Polymorphismus assoziiert waren (Ebstein et al., 1996).

1.5.4 Polymorphismen-Untersuchungen und Assoziationsstudien

Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung von krankheitsassoziierten Veränderungen im dopaminergen System sind Polymorphismen-Untersuchungen und damit verbunden Assoziationsstudien. Dabei handelt es sich um genetische, populationsbiologische Ansätze auf statistischer Basis.

Ein Allel mit einer Mutation, das mit einer Häufigkeit von $> 1\%$ in der Gesamtbevölkerung vorkommt, wird als Polymorphismus bezeichnet. Polymorphismen werden ca. alle hundert

Basenpaare im Genom gefunden, so daß solche sogenannten genetischen Marker über das gesamte Genom verteilt sind. Um Gene oder Orte auf dem Genom zu entdecken, die mit einer Erkrankung in Zusammenhang stehen, werden gewöhnlich zwei Ansätze verfolgt: familiäre Kopplungsanalysen oder Kopplungsanalysen, bei denen nach alleler Assoziation⁸ gesucht wird (= Assoziationsstudien). Die familiären Kopplungsanalysen stellen in Familien eine Beziehung zwischen verschiedenen gekoppelten Genorten her, denen ein Mendelscher Erbgang zugrunde liegt. Bei Assoziationsstudien wird in der allgemeinen Bevölkerung eine Beziehung zwischen Allelen gesucht, die identische genetische Herkunft besitzen und dadurch gekoppelt vorkommen. Die Kopplung ist allgemein ein notwendiges aber niemals ein hinreichendes Kriterium für eine allele Assoziation.

Bei Erkrankungen wie Alkoholismus oder Schizophrenie handelt es sich um komplexe, genetisch vererbte Krankheiten, die nicht nach Mendel vererbt werden und deren mindestens zwei Krankheitsallele nur geringe Beteiligung am Phänotyp zeigen. Um solche Krankheitsallele und damit eventuell ein an der Erkrankung beteiligtes Gen zu identifizieren, wird bei komplexen Erkrankungen der Ansatz der Assoziationsstudie bevorzugt, da die familiären Kopplungsanalysen einen Mendelschen Erbgang voraussetzen. Zwei Voraussetzungen für eine Assoziationsstudie sind eine exakte Selektion des Phänotyps, der beispielsweise über die spezifische Diagnose, Laborparameter und psychologische Fragebögen bestimmt werden kann, und die Identifizierung eines Kandidatengens, dessen Genprodukt eine klare biologische Bedeutung in bezug auf die Erkrankung besitzt. So ist die Beteiligung des dopaminergen Systems in der Ätiologie der Alkoholabhängigkeit unbestritten, so daß die Gene für die Dopaminrezeptoren Kandidatengene bei der Suche nach Anfälligkeitsloci darstellen können. Die Interpretation alleler Assoziationen ist dabei schwierig, da sie nicht wie die Kopplungsanalysen eine direkte Beziehung zwischen einem Genort und der Krankheit angeben, sondern nur eine Beziehung zwischen den verschiedenen Allelen. Ist eine Erkrankung mit einem Locus gekoppelt, wird sie gemeinsam mit ihm vererbt und liegt womöglich in der Nähe des Locus auf demselben Chromosom. Ist eine Erkrankung mit einem Allel assoziiert, wird sie statistisch häufiger mit diesem Allel weitergegeben als mit anderen Allelen. Daraus kann sich ein Hinweis auf eine gemeinsame Lage auf einem Chromosom oder eine Kopplung mit einem Locus ergeben. Der Einsatz von Assoziationsstudien war schon in einigen Fällen erfolgreich. Vor allem mit den HLA-Allelen konnten einige Erkrankungen, wie Multiple Sklerose oder rheumatoide Arthritis assoziiert werden (Braun, 1979).

Assoziationsstudien werden in drei Ansätzen verfolgt, je nach dem Anteil, mit dem das Kandidatengen an der Erkrankung beteiligt zu sein scheint. Die erste Möglichkeit ist die genetische fallkontrollierte Studie, hinter der die Hypothese steht, daß ein funktionell unterschiedliches Allel, beispielsweise des D₂-Rezeptors, unter alkoholabhängigen Patienten häufiger vorkommt als unter gesunden Kontrollen. Die Signifikanz wird dann mit einem

⁸ allele Assoziation ist die signifikante Kombination spezifischer Allele an verschiedenen Genorten

Chi²-Test überprüft. Bei diesem Ansatz ist die Auswahl der Kontrollen extrem wichtig (Lander & Schork, 1994), da die Frequenz des betrachteten Allels zwischen Populationen stark variieren kann (Barr & Kidd, 1993) und beispielsweise Mitteleuropäer genetisch nicht gleich Südeuropäern sind, obwohl sie populationsbiologisch beide zu den Kaukasiern gezählt werden. Um diese Populationsstratifikation zu umgehen, wurden neue Ansätze für Assoziationsstudien gesucht. Diese sogenannten familiengestützten Ansätze wie der *haplotype relative risk test* (HRR) und der *transmission disequilibrium test* (TDT) verbinden die Suche nach einer Allelbeziehung mit der Allelweitergabe in Familien, indem sie die Allele der Eltern eines Erkrankten als interne Kontrolle nehmen. Dadurch wird das Problem der ethnisch passenden Kontrollen gelöst. Beim HRR-Test (Terwilliger & Ott, 1992) typisiert man erkrankte Personen und ihre Eltern für eine Markerallel, von dem man annimmt, daß es mit der Erkrankung assoziiert ist und verwendet als "Kontrollen" die Allele, die nicht an den Patienten weitergegeben wurden. Der Unterschied in den Häufigkeiten wird mit einem Chi²-Test berechnet. Der TDT (Spielman & Ewans, 1993) geht von Familien mit einem oder mehreren betroffenen Nachkommen aus, bei denen mindestens ein Elternteil am Markerlocus für das mutmaßlich mit der Krankheit assoziierte Markerallel heterozygot ist. Dann werden die Häufigkeiten der weitergegebenen Allele und der nicht weitergegebenen Allele verglichen. Diese beiden Ansätze eignen sich am besten für komplexe Erkrankungen, setzen aber die Kenntnis von Allelen in sicheren Kandidatengenen voraus, was für die fallkontrollierten Studien nicht unbedingte Voraussetzung sein muß.

In der vorliegenden Arbeit wurde der fallkontrollierte Ansatz für die Untersuchung einer Assoziation von dopaminergen Kandidatengenen mit der Erkrankung Alkoholabhängigkeit benutzt. Er ist zuverlässig durchzuführen, wenn bekannt ist, daß ein Kandidatengen in die Ätiologie der Krankheit involviert ist. Dabei werden keine Polymorphismen verlangt, für die sicher ist, daß sie in Kandidatengenen liegen, wie dies bei den familiengestützten Assoziationsstudien der Fall ist. Außerdem konnte ein gut charakterisiertes Kontrollkollektiv ausgewählt werden.

1.6 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die Rolle genetischer Varianten im dopaminergen System im Tiermodell auf dopaminabhängiges motorisches Verhalten zu untersuchen. Beim Menschen sollte ihre Bedeutung für Alkoholabhängigkeit und Charaktereigenschaften festgestellt werden, die nach derzeitigem Wissen dopaminerg reguliert werden. Es sollten dazu verschiedene molekulargenetische Ansätze verfolgt werden.

Im ersten Teil sollte das durch den Dopaminagonisten Apomorphin hervorgerufene Verhalten im Tiermodell molekularbiologisch untersucht werden, um eventuelle Unterschiede in den Dopaminrezeptorgenen D_1 und D_2 der Tiere zu identifizieren.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten genetische Untersuchungen zu krankheitsassoziierten Veränderungen im dopaminergen System bei Patienten durchgeführt werden, die die Diagnose einer Alkoholabhängigkeit hatten. Anhand von Polymorphismen-Untersuchungen sollten genetische Varianten im dopaminergen System bestimmt werden. Mit Hilfe dieser genetischen Varianten sollte in Assoziationsstudien nach Assoziation der Alkoholabhängigkeit mit den Kandidatengenen des dopaminergen Systems gesucht werden. Um den Phänotyp der Erkrankung genauer definieren zu können, sollten Persönlichkeitsfragebögen und neuroendokrinologische Parameter dabei als zusätzliche Diagnosekriterien dienen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien und Geräte

2.1.1 Puffer und Lösungen

Agarosegel (x %) (100 ml)	x g Agarose 96 ml Aqua bidest. 4 ml 25×TBE
Agarosegel für RNA (100 ml)	1 g Agarose 5,6 ml Formaldehyd (2%) 10 ml 1xMOPS 84,4 ml DEPC-H ₂ O
DNA-Ladepuffer	0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylencyanol 40 % Saccharose
Ethidiumbromid-Färbelösung	Endkonzentration in H ₂ O: 5 µg/ml
Lösung D	250 g Guanidiniumthiocyanat 17,6 ml Na ₃ -Citrat (0,75 M; pH 7) 26,4 ml 10% Sarcosyl 293 ml DEPC-H ₂ O autoklavieren 0,72 % β-Mercaptoethanol frisch zugeben
MOPS (10x)	200 mM 3 N-Morpholin-Propansulfonsäure 50 mM Na-Acetat 10 mM EDTA (pH 7,0)
PCR Puffer	40 mM KCl, 10 mM Tris/HCl (pH 8,3) 0,1 mg/ml Gelatine, 1,5 mM MgCl ₂ Perkin-Elmer Cetus (USA)
RNA-Ladepuffer	250 µl Formamid (deionisiert) 83 µl Formaldehyd, 37% 50 µl 10xMOPS 0,01% (w/v) Bromphenolblau 0,01% (w/v) Xylencyanol

Tris-Borat-Elektrophoresepuffer (1×TBE)	90 mM Tris 90 mM Borsäure 1,25 mM Na ₂ EDTA
---	--

2.1.2 Enzyme

Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (Beverly, MA, USA) (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)
Reverse Transcriptase	Promega (Mannheim)
AmpliTaq-Polymerase	Perkin-Elmer (PCR Reagentien von Roche Molecular Systems, Branchburg, New Jersey, USA)
<i>Expand long template PCR System</i>	Boehringer Mannheim (Mannheim)
<i>Expand high fidelity PCR System</i>	Boehringer Mannheim (Mannheim)

2.1.3 Immunoassays

Immunoenzymetrischer Assay	BioChem ImmunoSystems GmbH (Freiburg)
Immunoradiometrischer Assay	MEDGENIX hGH-IRMA, MEDGENIX Diagnostics (MEDGENIX Group Deutschland, Ratingen)
Radioimmunoassay	DSL, Vertrieb IBL GmbH (Hamburg)

2.1.4 Rattenstämme

PVG	PVG/ OLaHsd (Harlan Winkelmann, Borchen)
Sprague Dawley	Hsd: Sprague Dawley SD (Harlan Winkelmann) CD-Ratte, Crl:CD®BR (Charles River Laboratory)
Wistar	HsdCpb: WU (Wistar Unilever; Harlan Winkelmann)

2.1.5 Molekulargewichtsstandards

Als Molekulargewichtsstandards wurden verwendet:

λ -DNA/ Hind III Marker (Boehringer Mannheim, Mannheim)

100 bp-Leiter (Gibco BRL/ Life Technologies, Berlin)

2.1.6 Synthetische Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden bei Pharmacia (Freiburg), MWG Biotech GmbH (Ebersberg) synthetisiert.

Primer zur Sequenzierung des D₁-Rezeptorgens der Ratten

D1.1 5'-AGG AAA CCA CAG GCA CCA G-3'

D1.2 5'-ACC CCA GCA CAA GAC AGA AC-3'

D1.a 5'-GAT GCG GGC AGT GTC TTG-3'

D1.b 5'-AGA GCT TCC TGG GGA GAG G-3'

D1.c 5'-GTG CTT GCC TGG AGC G-3'

D1.d 5'-ATG CTG CCT CTT TTT CTG AG-3'

D1.e 5'-GGA GAT GAT GCG CTG GG-3'

D1.f 5'-ATG CGA AAG GAG AAA TCC C-3'

D1.g 5'-AGT GGT TGG GGG AAG TCT G-3'

D1.h 5'-GCT TTG CCT TGT GCC AG-3'

D1.i 5'-TGA GAG GAA GAT GAC CCC C-3'

D1.j 5'-CCA CAC AAA CAC ATC GAA GG-3'

D1.k: 5'-ATG GGG GTG TTT GTG TGC-3'

D1.l 5'-CCC AAG GGA ACT CGT GG-3'

Primer zur Sequenzierung des D₂-Rezeptorgens der Ratten

mRNA-Bereich:

RD2.a 5'-TGA AGA GCC GTG CCA CC-3'

RD2.b 5'-GTC CGA AGA GCA GTG GGC-3'

RD2.c 5'-CAC AGC AAG CAT CCT GAA CC-3'

RD2.d 5'-GTA GGC CGT GGT GGG ATG-3'

RD2.e 5'-GGA GAA TGG ATG CTG CCC-3'

RD2.f 5'-GGA TGA GGT CTG GCC TGC-3'

RD2.cc 5'-GGG CAA CTG TAC CCA CCC-3'

Promotor und 5' untranslatierter Bereich:

RD2p.1 5'-TCA GAA AGC ACA ACA GCA GAA CG-3'

RD2p.2 5'-ACA AGA GGC GAC CAG CTC CG-3'

RD2p.22 5'-TAC AGA GGC CCC ACC CAC CC-3'

RD2p.3 5'-GTA CAA GGG GCG GGG TTC C-3'

RD2p.4 5'-ccc gtg cag aag cca cag ac-3'

RD2p.33 5'-GTG GGT GGG GCC TCT GTA-3'

RD2p.5 5'-GTT CCT TCC CCA GGC CCC AC-3'

RD2p.6 5'-GAG GCT TCC AGC TCC CGC C-3'

Primer zur Darstellung der DNA-Sequenz-Polymorphismen beim Menschen

D1.7 5'-TGG AAG AGC TGT CCC CAG-3'

D1.9 5'-GTA CCT TAG TTT CTT AAT AGC GA-3'

D2a 5'-CCG TCG ACG GCT GGC CAA GTC TA-3'

D2b 5'-CCG TCG ACC CTT CCT GAG TGT CAT CA-3'

D3a 5'-GCT CTA TCT CCA ACT CTC ACA-3'

D3b 5'-AAG TCT ACT CAC CTC CAG GTA-3'

D4-3 5'-GCG ACT ACG TGG TCT ACT CG-3'

D4-42 5'-AGG ACC CTC ATG GCC TTG-3'

DAT1.for 5´-TGT GGT GTA GGG AAC GGC CTG AGA-3´

DAT1.rev 5´-TGT TGG TCT GCA GGC TGC CTG CAT-3´

TH-2-for 5´-AGA GCC TCA TCG AGG ACG-3´

TH-2-rev 5´-CGA AGG CCA CCA GCT CAC-3´

D2-677 5´-ACT GGC GAG CAG ACG GTG AGG ACC C-3´

D2-676 5´-TGC GCG CGT GAG GCT GCC GGT TCG G-3´

2.1.7 Chemikalien und Materialien

Chemikalien:

Agarose LE	FMC (USA)
Agarose (Low melt)	Roth (Karlsruhe)
Apomorphin	Apothek des Uniklinikums der Universität Mainz
DEPC	Sigma (Deisendorf)
DMSO	Sigma (Deisendorf)
dNTPs	Promega (Mannheim)
DTT	Promega (Mannheim)
EDTA	Sigma (Deisendorf)
Ethanol	Riedel-de-Haen (Seelze)
Ethidiumbromid	Sigma (Deisendorf)
Guanidiniumthiocyanat	Roth (Karlsruhe)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Mineralöl	Sigma (Deisendorf)
MOPS	Roth (Karlsruhe)
Rnasin	Promega (Mannheim)
Sarcosyl	Sigma (Deisendorf)
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Sigma (Deisendorf)
Tris	Merck (Darmstadt)
Tris-HCl	Merck (Darmstadt)
X-Gal	Roth (Karlsruhe)

Alle Chemikalien wurden im höchsten erhältlichen Reinheitsgrad bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet.

Materialien

EDTA-Monovetten	S-Monovetten, Sarstett (Nümbrecht)
PCR-Reaktionsgefäße (0,5 ml)	Perkin-Elmer (USA) MWG Biotech (Ebersberg)
Pipetten	Eppendorf
Plastikgefäße	Roth (Karlsruhe)

Geräte

DNA-Sequenziergerät	ABI PRISM 310 Genetic Analyzer Applied Biosystems GmbH (Weiterstadt) Perkin-Elmer Division
Gel-Analyse-System	Bio-Rad Image Analysesystem, Software: Molecular Analyst Software 1.5 (Bio-Rad, München)
Gelelektrophoresesysteme	Elektrophoresekammern (Roth, Karlsruhe)
PCR-Geräte	DNA Thermal Cycler 480 Perkin-Elmer Cetus (USA) OmniGene, Hybaid (Heidelberg)
Photometer	Typ Uvikon, Tegimenta, (Rotkreuz, Schweiz)
Spannungsgeräte	Microcomputer Electrophoresis Power Supply Consort IMS
Dispersionsystem (Homogenisator)	IKA Labortechnik (Staufen)
Zentrifugen	Zentrifuge 5415 C (Eppendorf, Hamburg) Sorvall RC 28 S (Du Pont, Bad Homburg) Sorvall RMC 14 (Du Pont, Bad Homburg)

2.2 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden Ratten der Stämme Wistar, Sprague Dawley und PVG der Firma Harlan Winkelmann und Ratten des Stammes Sprague Dawley der Firma Charles River verwendet. Die Anzahl und die Verwendung der Tiere in den unterschiedlichen Versuchen sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tab. 3: Übersicht über die verwendeten Versuchstiere

Angegeben sind alle verwendeten Tiere mit der Stammesbezeichnung und der Bezugsquelle.

Versuch	Anzahl der Tiere	Stamm (Lieferant)
Verhaltenstest mit Apomorphin	45	Wistar (Harlan Winkelmann)
davon Tiere für Sequenzanalyse	6	
Bestätigung der Sequenzierung	2	Sprague Dawley (Charles River)
Genotypisierung der Ratten für die D ₂ Promotorpolymorphismen	39	Wistar (Harlan Winkelmann)
	10	Sprague Dawley (Harlan Winkelmann)
	1	Sprague Dawley (Charles River)
	11	PVG (Harlan Winkelmann)

2.2.1 Apomorphintest und Verhaltenstest

Für die Verhaltenscharakterisierungen nach Apomorphingabe wurden 23 adulte männliche und 22 adulte weibliche Wistar Ratten (Harlan Winkelmann) mit einem Gewicht von 200-300 g verwendet. Die Tiere bekamen eine einmalige subkutane Injektion von 2 mg/kg Apomorphin und wurden aufgrund ihrer lokomotorischen Aktivität und ihrem stereotypen Verhalten charakterisiert. Die verschiedenen Aktivitätsformen wurden in einer *open field* Testanordnung dem sogenannten "Animex-Motility-Meter" registriert (Havemann et al. 1986). Die Stereotypen wurden nach einer Methode von Lewis und Mitarbeitern (1985) und Havemann und Mitarbeitern (1986) durch Beobachtung ausgewertet. Insgesamt wurden drei Verhaltens- oder Stereotypieformen unterschieden (vgl. 1.5.1): "Nager", "Schnüffler" und "Lecker". In dieser Arbeit wurden die Tiere, die die zwei Verhaltensformen des Nagens und des Schnüffeln zeigen, verwendet, da diese Tiere die beiden extremen Verhaltensvarianten waren (Havemann et al. 1995) (vgl. 1.5.1).

Zur Einteilung der Ratten in Verhaltensgruppen dienten die aus dem Test im "Animex-Motility-Meter" erhaltenen Parameter "horizontale Aktivität", "vertikale Aktivität" und "gelaufene Strecke" (totale Distanz) sowie die Beobachtungen über das stereotype Verhaltensmuster der Tiere. Die Parameter wurden über Infrarotsensorleisten erhoben. Der Meßparameter "horizontale Aktivität" bezeichnete die Summe aller unteren, über die 3 cm hohen Sensorleisten erhaltenen Impulse (xy-Impulse). Sie wurden als Maß für die Gesamtmotilität des Versuchstieres angesehen. Sowohl lokomotorische Aktivität (Vorwärtslaufen) als auch die nicht lokomotorische Aktivität (stereotype Kopfbewegungen) führten zu xy-Impulsen. Die "gelaufene Strecke" (totale Distanz) gab die gesamte während des Testzeitraums zurückgelegte Laufstrecke an. Die "vertikale Aktivität" wurde in die mittlere "vertikale Aktivität" (10 cm hohe Lichtschranke) und die hohe "vertikale Aktivität" (16 cm hohe Lichtschranke) unterteilt. Die mittlere "vertikale Aktivität" ergab sich aus der Summe der über die mittlere Sensorleiste erfaßten Impulse (Kletter- oder Aufrichtbewegungen). Die hohe "vertikale Aktivität" bezeichnete die Summe der über die hohe Sensorleiste erhaltenen Impulse. Die Stereotypen wurden mittels eines speziellen Punktesystems (Lewis et al. 1985; Havemann et al. 1986) während eines 10 minütigen Meßintervalls ermittelt. Um ein bestimmtes Verhalten als vorherrschend zu klassifizieren, mußten mindestens 10 Punkte erreicht werden. Die Einteilung der Tiere zu den Gruppen erfolgte durch einen trainierten Beobachter aus der Arbeitsgruppe von U. Havemann, wo die Tests durchgeführt wurden.

2.2.2 Auswahl der Tiere für die Sequenzierung der Dopaminrezeptorgene D₁ und D₂

Für die Sequenzierungen wurden je drei Tiere nach der Verhaltenscharakterisierung im "Animex-Motility-Meter" ausgewählt. Sie hatten sehr hohe Stereotypie-Werte bei der Einteilung in die zwei Verhaltensgruppen erhalten und die jeweilige Stereotypieform am ausgeprägtesten gezeigt. Die Charakterisierung der sechs Tiere und ihre Bewertung aus dem Test im "Animex-Motility-Meter" ist in der folgenden Tabelle aufgeführt. Alle sechs untersuchten Tiere erreichten zwischen 14 und 16 Punkten bei der Einteilung in ihre Gruppe. Dies war möglich, da es nach dem Punktesystem zur Beurteilung der Stereotypen für eine kontinuierliche gezeigte Stereotypie mehr Punkte gab als für ein diskontinuierliches Auftreten der Stereotypie (Havemann et al., 1986; Surmann et al., 1995).

Tab. 4: Charakterisierung der drei ausgewählten "Nager" und "Schnüffler" im "Animex-Motility-Meter"

Angegeben sind die Meßparameter für die "vertikale Aktivität" unterteilt in die mittlere "vertikale Aktivität" (Summe aller über die 10 cm hohe Sensorleiste erhaltenen Impulse = m. v. Akt.) und die hohe "vertikale Aktivität" (Summe aller über die 16 cm hohe Sensorleiste erhaltenen Impulse = h. v. Akt.), die "horizontale Aktivität" (= Summe aller über die 3 cm hohe Sensorleiste erhaltenen Impulse), die gelaufene Strecke (= Laufstrecke während des Meßzeitraums), und die Stereotypie-Werte (S = "Schnüffler", L = "Lecker", G = "Nager").

Ratte	vertikale Aktivität		horizontale Aktivität	gelaufene Strecke	Stereotypie-Werte		
	m.v.Akt	h.v.Akt			totale Distanz	S	L
Ratte N1 (Nager)	0	32	1847	914	4	1	15
Ratte N2 (Nager)	22	11	2865	1189	0	0	16
Ratte N3 (Nager)	0	6	4375	1904	7	0	16
Ratte S1 (Schnüffler)	1	56	2901	1983	16	0	0
Ratte S2 (Schnüffler)	0	1	3373	1761	16	0	0
Ratte S3 (Schnüffler)	0	29	4891	2441	14	0	9

2.3 Patienten- und Kontrollprobandenstichproben

2.3.1 Patientenstichprobe

Die Patienten, die für die Isotypisierung von Genen des dopaminergen Systems rekrutiert wurden, erfüllten die Diagnose einer Alkoholabhängigkeit nach den Kriterien des DSM-IV (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th edition; diagnostic system of the American Psychiatric Association*). Die Patienten hatten ihr schriftliches Einverständnis für die Isotypisierung gegeben und waren konsekutiv zur stationären Entgiftung in der Psychiatrischen Klinik der Universität Mainz aufgenommen worden. Das DSM-IV wird neben dem ICD-10 (*International Classification of Diseases-10; Klinisch-diagnostische Leitlinien der Weltgesundheitsorganisation*) weltweit zur Klassifikation und Diagnose psychischer Störungen benutzt. In den meisten Fällen lag eine schwere Alkoholabhängigkeit vor. Die Diagnose wurde von Ärzten der Psychiatrischen Klinik gestellt.

Für die Isotypisierung der Patienten wurden zwei Stichproben rekrutiert, eine Stichprobe von 161 Patienten stand für die Isotypisierung der Dopaminrezeptorgene D_1 , D_2 , D_3 , D_4 , des Dopamintransportergens DAT1 und des Tyrosinhydroxylasegens (TH), von 83 weiteren Patienten wurden nur die Daten für die Untersuchung der Isotypen der Dopaminrezeptorgene D_2 und D_4 erhoben. Dadurch ergab sich für die Isotypisierung der Dopaminrezeptorgene D_2 und D_4 eine Gesamtanzahl von 244 Patienten.

Tab. 5: Demographische Daten der beiden Patientenstichproben, Isotypisierungen und Anzahl der Persönlichkeitsfragebögen (vgl.1.5.3)

Patienten	Stichprobe 1, n = 161	Stichprobe 2, n = 83	gesamt n = 244
Geschlecht	123 Männer; 38 Frauen	64 Männer; 19 Frauen	187 Männer, 57 Frauen
Alter	45 ± 10,1 Jahre	44,2 ± 9,4 Jahre	44,6 ± 10, 1 Jahre
Isotypisierung	D_1 , D_2 , D_3 , D_4 , TH, DAT1	D_2 , D_4	
TCI (vgl. 1.5.3)	126	37	163

2.3.2 Subgruppierung der Patientenstichprobe nach Cloninger

In der Stichprobe der alkoholabhängigen Patienten wurden die Patienten nach der Theorie von Cloninger und Mitarbeitern (1987) (vgl. 1.4.1) in zwei Typen eingeteilt. Die Einteilung anhand der psychopathologischen Daten wurde von einem Mitarbeiter der Klinik nach den Vorgaben von Gilligan und Mitarbeitern (1988) vorgenommen, ohne daß er Kenntnis von den Genotypen der Alkoholiker hatte.

2.3.3 Kontrollprobandenstichprobe

Die für diese Studie ausgewählten Kontrollprobanden hatten keine Abhängigkeits- oder Mißbrauchsdiagnose nach DSM-IV und durften keine akute psychiatrische Erkrankung nach DSM-IV und keine auffälligen CDT (*carbohydrate-deficient transferrin*) und γ GT-Werte (γ -Glutamyl-Transpeptidase) aufweisen. Erhöhte CDT und γ GT-Aktivität sind Laborparameter, die auf eine Alkoholabhängigkeit oder einen Alkoholmißbrauch hindeuten. Die Kontrollprobanden wurden nach Alter und Geschlecht passend zur Patientengruppe aus-

gewählt und hatten ihr schriftliches Einverständnis für die Isotypisierung gegeben. Von insgesamt 97 Kontrollprobanden wurden Daten zu den Genotypen der Dopaminrezeptorgene D₁, D₂, D₃, D₄, des Dopamintransportergens DAT1 und des Tyrosinhydroxylasegens in dieser Arbeit erhoben.

Tab. 6: Demographische Daten der Kontrollprobandengruppe, Isotypisierungen und Anzahl der Persönlichkeitsfragebögen (vgl. 1.5.3)

Kontrollprobanden	n = 97
Geschlecht	72 Männer; 25 Frauen
Alter	41,2 ± 11,0 Jahre
Isotypisierung	D ₁ , D ₂ , D ₃ , D ₄ , TH, DAT1
TCI (vgl. 1.5.3)	67

2.4 Das Temperament- und Charakter-Inventar (TCI)

Zur Beschreibung der Struktur und Entwicklung von Persönlichkeit bei alkoholabhängigen Patienten und Kontrollprobanden wurde die deutsche Version des Temperament- und Charakter-Inventars (*Temperament and Character Inventory (TCI)*) (Cloninger et al. 1993; Richter et al. 1997) verwendet (vgl. 1.5.3). Das TCI (Version 9) beschreibt vier Temperaments- und drei Charakterdimensionen und besteht aus 240 Fragen, die Meinungen, Einstellungen, Interessen und persönliche Gefühle erfragen. Die Patienten und Kontrollprobanden sollten darauf anhand einer dichotomen Antwortskala mit "ja" bzw. "nein" reagieren. Das TCI wurde von den Patienten und Kontrollprobanden selbst ausgefüllt. Außer der Temperamentsdimension Beharrungsvermögen (*persistence*; Skala mit 8 Fragen) waren alle Temperamentsdimensionen in mehrere Subskalen untergliedert. Die Untergliederung in die Subskalen war wie folgt: Neugierverhalten (*novelty seeking*) mit 40 Fragen, 4 Subskalen; Schadensvermeidung (*harm avoidance*) mit 35 Fragen, 4 Subskalen; Belohnungsabhängigkeit (*reward dependence*) mit 24 Fragen, 3 Subskalen. Auf die Auswertung der vier Temperaments- oder Persönlichkeitsdimensionen bezogen sich insgesamt 107 Fragen.

In dieser Arbeit wurde nur mit den Temperamentsdimensionen gearbeitet, da diese nach der Theorie von Cloninger zu den Merkmalen gehören, die überwiegend genetisch determiniert

sind und unabhängig voneinander vererbt werden (vgl. 1.5.3). Daher wird nur auf die Methodik zur Auswertung dieser vier Dimensionen eingegangen. Die englischen Begriffe haben sich in der deutschen Fachterminologie etabliert. Sie werden auch in dieser Arbeit in englisch verwendet. Aus den zwei Stichproben der alkoholabhängigen Patienten wurden von 163 Personen und 67 Kontrollprobanden die Daten für den TCI erhoben (vgl. Tab. 5, 6). Dabei bestand keine Kenntnis der genetischen Daten.

2.5 Apomorphintest bei alkoholabhängigen Patienten

Der Apomorphintest wurde bei einer Stichprobe von 16 männlichen, alkoholabhängigen Patienten und 16 männlichen Kontrollprobanden durchgeführt. Alle Probanden hatten ihr Einverständnis für den Test erklärt. Die Patienten waren mindestens 10 Tage nach der Entgiftung alkoholabstinent. Der Test bestand aus einer einmaligen subkutanen Apomorphingabe (0,01 mg/kg). Daraufhin wurde zwölfmal Blut abgenommen und im Serum wurden die Konzentrationen von Prolaktin, Somatotropin (GH) und Cortisol gemessen. Die Konzentration an GH wurde mittels eines immunoradiometrischen Assay (hGH-IRMA Medgenix; Düsseldorf) bestimmt. Das Detektionslimit für GH betrug 0,1 ng/ml, der Interassay-Variationskoeffizient (CV) betrug 9.0-13.6%. Die Konzentrationsbestimmung für Cortisol wurde mit einem Radioimmunoassay (DSL, IBL GmbH, Hamburg) durchgeführt, dessen Detektionslimit 0,5 ng/ml war und dessen Interassay-CV 5% betrug. Die Prolaktinkonzentration wurde mit einem immunoenzymetrischen Assay (PRLSerozym, Serono Diagnostics; Freiburg) im Serum ermittelt. Für Prolaktin war die Sensitivität 4 mIU/l und der Interassay CV 3.9-5.8%. Bei allen Tests handelte es sich um kommerzielle Tests, die exakt nach den Angaben der Hersteller durchgeführt wurden. Für die molekularbiologischen Untersuchungen wurden die Genotypen von drei Polymorphismen des Dopaminrezeptorgens D₂ (vgl. 2.9) ermittelt.

Die 16 Patienten waren Männer mit einem Durchschnittsalter von $39,7 \pm 12,2$. Bei den 16 Kontrollprobanden handelte es sich ebenfalls um Männer mit einem Durchschnittsalter von $39,3 \pm 8,3$. Die relativ kleine Stichprobe ergab sich, da der Test aufwendig war und von einer hohen Abbrecherquote aufgrund der unangenehmen Nebenwirkungen, wie Übelkeit und Erbrechen, begleitet war, die die Patienten im Entzug schlecht tolerierten.

2.6 Isolierung von DNA und RNA

2.6.1 Isolierung von DNA aus Blut

Zur Isolierung von DNA aus Blut wurde der *QIAmpMaxi Blood Kit* der Firma QIAGEN (Hilden) verwendet. Die Aufarbeitung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Das Blut wurde in 10 ml EDTA-Monovetten abgenommen und bis zur Aufarbeitung bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Es wurden 5 ml Blut zur DNA-Isolierung verwendet. Eingefrorene Blutproben wurden bei RT aufgetaut und dann in die Aufarbeitung eingesetzt. Für die Isolierung wurde das Blut mit dem Lysepuffer AL versetzt, bei 70 °C für 10 min inkubiert und mit der gleichen Menge 100%igem Ethanol versetzt auf die Säule gegeben. Der folgende dreiminütige Zentrifugationsschritt diente zur Bindung der DNA an die QIAGEN-Säulen. Anschließend wurde die DNA je einmal mit den Puffern AW1 und AW2 gewaschen und mit 600 µl AE-Puffer eluiert. Um die gesamte gebundene DNA zu erhalten, wurde das Eluat erneut auf die Säule gegeben und zentrifugiert. Anschließend wurden von den DNA-Lösungen für den Einsatz in die PCR Arbeitsverdünnungen mit einer Konzentration von 100 ng/µl hergestellt. Die Stammlösungen wurden bei -20 °C eingefroren, während die Arbeitsverdünnungen bei 4 °C gelagert wurden.

2.6.2 Isolierung von RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus bis zu 30 mg tiefgefrorenem Rattenhirngewebe erfolgte mit dem QIAGEN *RNeasy mini total RNA Kit* (QIAGEN, Hilden). Die Präparationen wurden nach der Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden 20-30 mg Gewebe in 700 µl Puffer RLT im Ultrathorax homogenisiert. Das Lysat wurde 3 min bei 14000 Upm (Zentrifuge 5415 C Eppendorf) zentrifugiert und der Überstand mit 1 Volumen 70%igem Ethanol versetzt. Davon wurden 700 µl auf die *RNeasy* Säule gegeben, 15 s bei 8000×g zentrifugiert und anschließend mit 700 µl RW1 bei 8000×g 15 s gewaschen. Mit 500 µl RPE Puffer wurde die Säule zweimal gewaschen und mit einer 2 minütigen Zentrifugation bei 8000×g getrocknet. Eluiert wurde die RNA mit 50 µl RNase-freiem Wasser und dann bei -80 °C gelagert.

Die Isolierung von größeren Mengen Gesamt-RNA (1-2 µg) erfolgte nach einer modifizierten Version der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987). Dazu wurde das gefrorene Rattengehirn gewogen, pro 100 mg Gewebe in 2,5 ml Lösung D im Dispersionssystem homogenisiert, 1/10 Volumen 2M Natriumacetat (pH 4,0) zugegeben und die RNA durch Zugabe von 7,5 ml wassergesättigtem Phenol und 1,5 ml Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) von Proteinen und DNA Resten über eine Zentrifugation von 20 min bei 10 000×g getrennt. Durch Zugabe von 1 Volumen Isopropanol wurde die RNA aus der wäßrigen Phase bei

4 °C gefällt, sedimentiert und der Rückstand derselben Extraktionsprozedur noch einmal unterzogen. Das so erhaltene RNA Pellet wurde mit 75% Ethanol gewaschen, vakuumgetrocknet und in 250 µl DEPC-Wasser gelöst. Hieran schlossen sich zwei Phenolextraktionen mit Tris-gesättigtem Phenol, und eine Chloroformextraktion an. Die RNA wurde aus der wäßrigen Phase nach Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2 Volumen Ethanol durch eine Zentrifugation von 20 min bei 10 000×g gefällt, mit 75%igem Ethanol gewaschen, vakuumgetrocknet und in 100 µl DEPC-Wasser gelöst. Gelagert wurde die RNA bei -80 °C.

2.7 DNA- und RNA-Standardmethoden

2.7.1 Restriktionsverdau

Für einen Restriktionsverdau wurde je nach Ansatz 1-30 µg PCR-Produkt oder Plasmid-DNA eingesetzt. Die Reaktion wurde je nach Enzym bei der vom Hersteller vorgeschriebenen Temperatur und mit dem mitgelieferten Reaktionspuffer durchgeführt. Die Inkubationen wurden im Wasserbad bei der für das gewählte Enzym spezifischen Temperatur durchgeführt. Die Dauer der Reaktion und die eingesetzte Enzymmenge wurden gemäß dem Versuchszweck und der Qualität der zu restringierenden DNA gewählt. Im allgemeinen wurden 20-50 Units in einen Restriktionsansatz eingesetzt und für 2-16 Stunden restringiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1/6 Volumen DNA-Stoppuffer abgestoppt. Für den Restriktionsverdau der verschiedenen Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLPs) werden die genauen Bedingungen unter 2.9 angegeben.

2.7.2 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Restringierte DNA-Fragmente sowie PCR-Produkte wurden auf horizontalen Agarosegelen aufgetrennt. Je nach Auftrennungsbereich wurden die Gele 1,0 - 4,0%ig gegossen und die Spannung zwischen 60-100 Volt (20-100 mA) gewählt. Als Puffersystem diente 1×TBE Puffer. Die Gele wurden nach einer Ethidiumbromidfärbung von 5-10 min unter UV-Licht mit einer Polaroidkamera oder mit dem Bio-Rad Image Analyse System (Bio-Rad, München) dokumentiert. Als Molekulargewichtsstandards dienten eine 100 bp-Leiter oder Hind III verdaute Lambda-DNA.

2.7.3 Agarose-Gelelektrophorese von RNA

Für die Auftrennung von RNA-Molekülen wurden horizontale 1%ige RNA-Agarosegele und 1xMOPS-Puffer als Laufpuffer verwendet. Die RNA wurde 10 min bei 65°C in RNA-Ladepuffer denaturiert, auf das Agarosegel geladen und bei 25 Volt (10-32 mA) für 5-6 Stunden bei kleinen Gelen (6 × 7,5 cm) oder bei großen Gelen (10 × 11,5 cm) über Nacht aufgetrennt. Nach einer Ethidiumbromidfärbung von 5 min wurden die Gele 30-60 min in DEPC-Wasser entfärbt und unter UV Licht photographiert.

2.7.4 Aufreinigung von DNA über Agarosegele

Agarosegele mit niedrigem Schmelzpunkt wurden zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten benutzt, die mit unspezifischen PCR-Produkten verunreinigt waren. Dazu wurde *low melting point* Agarose (LMP-Agarose, Roth) verwendet. Zur Wiedergewinnung der DNA-Fragmente aus dem Gel wurde der *QIAquick Gel Extraction Kit* von QIAGEN (Hilden) benutzt und nach dem Protokoll des Herstellers gearbeitet. Dabei wurde das Gelstück im Verhältnis 1:3 mit Puffer QC (QIAGEN) gemischt, für 10 min bei 50 °C inkubiert, mit 1 Volumen Isopropanol versetzt und auf die Säule geladen. Nach einer einminütigen Zentrifugation wurde die Säule mit 500 µl Puffer QC gereinigt, dann mit 750 µl Waschpuffer gewaschen und die DNA mit 50 µl H₂O eluiert. Da die wiedergewonnene DNA salzfrei sein sollte, um für Sequenzreaktionen eingesetzt zu werden, wurde die Säule mit dem Waschpuffer 5 min und vor der Elution 1 min inkubiert. Die in Wasser gelöste DNA wurde dann direkt in die Sequenzreaktionen eingesetzt.

2.7.5 Fällung von DNA

DNA wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 Volumen 100%igem Ethanol und einer 12-16 stündigen Inkubation bei -20 °C oder einer 20 minütigen Inkubation bei -70 °C gefällt. Nach 30 Minuten Zentrifugation bei 14000 Upm (Zentrifuge 5415 C Eppendorf) und 4 °C wurde die DNA mit 70%igem Ethanol gewaschen, vakuumgetrocknet und in einem Volumen von 10-50 µl Aqua bidest. aufgenommen je nach DNA-Konzentration, die zur Weiterverwendung der Proben gewünscht wurde.

Für die Abtrennung von Fragmenten, die kleiner als 100 bp waren, wurde die Fällung mit Ammoniumacetat und Isopropanol durchgeführt. Es wurde 1 Volumen 4 M Ammoniumacetat und 2 Volumen Isopropanol zugegeben, 30 min bei 14000 Upm

(Zentrifuge 5415 C Eppendorf) zentrifugiert, mit 70%igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Anschließend wurde die DNA je nach gewünschter Konzentration in 10-50 μ l Aqua bidest. gelöst.

2.8 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die PCR wurde nach der Methode von Saiki und Mitarbeitern (1988) durchgeführt und erfolgte in 25-50 μ l Ansätzen mit 100-200 ng DNA, 40 mM KCl, 10 mM Tris/HCl (pH 8,3), 0,1 mg/ml Gelatine, 1,5 mM $MgCl_2$, je 10 pmol der beiden Primer, je 200 mM der vier dNTPs sowie 2,5 U der Taq-Polymerase (AmpliTaq DNA Polymerase, Perkin-Elmer Cetus, USA). Bei einigen PCR-Reaktionen wurden zusätzlich 5% DMSO oder modifizierte Nukleotide eingesetzt, um die Amplifikation zu erleichtern (vgl. 2.9.4). Die Reaktionen erfolgten in einem OmniGene PCR-Gerät von Hybaid (Heidelberg). Der erste Schritt der PCR-Reaktion war eine Denaturierung bei 94-96 °C für 1-4 min. Die Amplifikationsbedingungen wurden dann in Abhängigkeit von den verwendeten Primern und der verwendeten DNA-Polymerasen gewählt (vgl. 2.9), wobei eine Extensionsphase von 7 min im letzten Zyklus immer eingehalten wurde. Anschließend wurden die Proben auf 4 °C abgekühlt und je nach Amplifikationseffizienz 5-25 μ l des PCR-Ansatzes auf einem Agarosegel charakterisiert.

Im Falle von GC-reichen DNA-Bereichen oder besonders langen Amplifikaten wurde mit dem *Expand high fidelity-* oder dem *Expand long template PCR System* nach Angaben des Herstellers gearbeitet (Boehringer Mannheim). Das *Expand high fidelity-* und das *Expand long template PCR System* enthalten unterschiedliche Mischungen aus den DNA-Polymerasen *Taq* und *Pwo*. Diese Mischungen besitzen durch ihren Anteil an *Pwo DNA Polymerase* eine Amplifikationsgenauigkeit von 26×10^{-6} Fehler pro Base (Amoroso et al. 1998) während die *Taq DNA Polymerase* Fehlerrate von 2×10^{-4} aufweist (Cha et al. 1993). Zudem besitzt die *Pwo Polymerase* eine 3'-5' Exonukleaseaktivität (*proofreading activity*), wodurch eventuelle Fehler korrigiert werden. Diese war beispielsweise für die Sequenzierung der Dopaminrezeptorgene der Ratten wichtig, da so Fehler der DNA-Polymerasen während der vorangegangenen PCR nahezu ausgeschlossen werden konnten. Die Mischungen besitzen eine höhere Prozessivität⁹ und liefern somit für die Amplifikation von GC-reichen DNA-Bereichen längere Amplikate und eine höhere Ausbeute an PCR-Produkt.

⁹Fähigkeit der DNA-Polymerasen an der DNA zu halten und das DNA-Stück bis zum Ende abzulesen

2.9 Reaktionen zur Darstellung der DNA-Sequenz-Polymorphismen

Zur Darstellung der Polymorphismen wurde der DNA-Bereich mit Hilfe der PCR amplifiziert und das PCR-Produkt mit dem für den Polymorphismus spezifischen Restriktionsenzym restringiert (vgl. 2.7.1). Die Auswertung der Genotypen erfolgte mit Hilfe von 1,8 - 4%igen Agarosegelen, auf dem die unterschiedlichen Fragmentlängen zu erkennen waren. Untersucht wurden je ein RFLP der Dopaminrezeptorgensubtypen 1, 2, 3 (D₁-, D₂-, D₃-Rezeptorgene), ein RFLP des Tyrosinhydroxylasegens (TH-Gen), sowie ein VNTR (*variable number of tandem repeats*) des Dopaminrezeptorgensubtyps 4 (D₄-Rezeptorgen) und des Dopamintransportergens 1 (DAT1). Zusätzlich wurden die zwei Polymorphismen

-141C Ins/Del und A-241G aus der Promotorregion und der 5' untranslatierten Region (5'UTR) des D₂-Rezeptorgens untersucht. Die Polymorphismen und die Amplifikationsbedingungen werden im folgenden näher erläutert.

2.9.1 Der Bsp1286I RFLP des D₁-Rezeptorgens

Der Bsp1286I-Polymorphismus liegt im 3'UTR des D₁-Rezeptorgens. Die Schnittstelle für Restriktionsenzym Bsp1286I wurde über den zweiten Primer (D1.9) in das PCR-Produkt eingeführt (Cichon et al., 1994). Der Verdau des 189 bp langen PCR-Produktes mit Bsp1286I ergab zwei Fragmente mit 166 bp und 23 bp Länge, wenn an der Position +1403 anstelle eines Thymins ein Cytosin vorkam (T → C).

In einem 50 µl Ansatz wurden 200 ng DNA, 5 µl 10x PCR-Puffer, je 10 pmol der Primer D1.7 und D1.9 (vgl. 2.1.6), je 200 mM der vier dNTPs sowie 2,5 U der AmpliTaq DNA Polymerase gemischt und in einem PCR-Gerät wie folgt inkubiert:

Denaturierung:	3 min	95 °C
für 40 Zyklen:	1 min	95 °C
	1 min	57 °C
	1 min	72 °C
letzte Extension:	7 min	72 °C

Anschließend wurde ca. 1 µg des PCR-Produktes mit 11,5 Units Restriktionsenzym Bsp1286I für 5-8 Stunden bei 37 °C restringiert (vgl. 2.7.1) und auf ein 4%iges Agarosegel aufgetragen.

2.9.2 Der TaqI A RFLP des D₂-Rezeptorgens

Amplifiziert wurde ein DNA-Stück von 318 bp aus dem D₂-Rezeptorgen, das einen RFLP für Taq^oI enthält (Grandy et al., 1993). Der TaqI A RFLP liegt ca. 10 kb außerhalb des codierenden Bereichs im 3'UTR und entsteht durch den Basenaustausch von Adenin zu Guanin (A→G). Die Restriktion des amplifizierten Bereichs ergab beim Auftreten der Schnittstelle zwei Fragmente mit 184 bp und 134 bp Länge.

In einem Reaktionsvolumen von 50 µl wurden 200 ng DNA, 5 µl 10x PCR-Puffer, jeweils 10 pmol der Primer D2a und D2b (vgl.2.1.6), je 200 mM der vier dNTPs sowie 2,5 U der AmpliTaq DNA Polymerase gemischt und mit folgendem Programm inkubiert:

Denaturierung:	4 min	95 °C
für 35 Zyklen:	1 min	95 °C
	1 min	60 °C
	1 min	72 °C
letzte Extension:	7 min	72 °C

Die Menge von ca. 1 µg des amplifizierten PCR-Produktes wurde danach mit 30 U des spezifischen Restriktionsenzym Taq^oI für 5-8 Stunden bei 65 °C restringiert (vgl. 2.7.1). Die entstandenen Fragmente wurden auf einem 1,8%igen Agarosegel aufgetragen.

2.9.3 Der MscI (Bali) RFLP des D₃-Rezeptorgens

Zur Darstellung des Polymorphismus wurde ein Bereich von 463 bp aus dem ersten Exon des D₃-Rezeptorgens amplifiziert. An dieser Position entsteht durch einen Basenaustausch von Adenin zu Guanin (A→G) eine zusätzliche Schnittstelle für das Restriktionsenzym MscI (Isoenzym zu Bali), wodurch das entstandene PCR-Produkt statt zwei drei Schnittstellen für MscI besitzt (Lannfeld et al., 1992). Der Basenaustausch führt in der codierenden Region zu einem Aminosäureaustausch von Serin zu Glycin. Der Polymorphismus wird auch als Ser9Gly-Polymorphismus bezeichnet. Das 463 bp lange DNA-Fragment wird durch das spezifische Enzym MscI in drei bzw. vier Fragmente geteilt [(305 bp+111 bp+47 bp) (207 bp + 98 bp) + 111 bp + 47 bp].

In einem Reaktionsvolumen von 50 µl wurden 200 ng DNA, 5 µl 10x PCR-Puffer, je 10 pmol der Primer D3a und D3b (vgl. 2.1.6), je 200 mM der vier dNTPs sowie 2,5 U der AmpliTaq DNA Polymerase gemischt und mit folgendem Programm inkubiert:

Denaturierung:	4 min	95 °C
für 35 Zyklen:	1 min	95 °C
	1 min	59,5 °C
	1 min	72 °C
letzte Extension:	7 min	72 °C

Die Menge von ca. 1-1,5 µg des PCR-Produktes wurde danach mit 4,5 U des Restriktions-enzymys MscI bei 37 °C für 5-8 Stunden restringiert (vgl. 2.7.1) und die Fragmente auf einem 1,9%igen Agarosegel aufgetrennt.

2.9.4 Der Exon III Polymorphismus des D₄-Rezeptorgens (48bp-repeat)

Der Exon III (48bp-repeat) Polymorphismus des D₄-Rezeptorgens liegt im dritten Exon, das für die dritte cytoplasmatische Schleife des Dopaminrezeptors kodiert (Lichter et al. 1993). Das 48 bp lange repetitive Element kann zwischen zwei- und zehnmal in einem Allel vorkommen, so daß die Größe der PCR-Produkte von 331 bp bis 763 bp reicht.

In einem 50 µl Ansatz wurden 300 ng DNA, 5 µl 10x PCR-Puffer ohne MgCl₂, je 10 pmol der Primer D4-3 und D4-42 (vgl. 2.1.6), je 200 mM dATP, dCTP, dTTP, je 100 mM dGTP und deaza-dGTP, sowie 1 mM MgCl₂ und 5% DMSO gemischt und in einem PCR-Gerät für 1 min auf 99 °C erhitzt. Dann wurden 2,5 U der AmpliTaq DNA Polymerase (Perkin-Elmer, USA) zugegeben und wie folgt inkubiert:

Denaturierung:	1 min	99 °C
für 40 Zyklen:	1 min	95 °C
	1 min	53,5 °C
	1 min	72 °C
letzte Extension:	7 min	72 °C

Für die Auftrennung der Fragmente wurde ein 1,8%iges Agarosegel verwendet und 25 µl des PCR-Ansatzes auf das Gel geladen.

2.9.5 Der VNTR Polymorphismus des Dopamintransportergens1 (40bp-repeat)

Das 40 bp lange repetitive Element (40bp-repeat Polymorphismus) liegt in der 3'UTR des Dopamintransportergens (Gen SLC6A3). Die Anzahl der 40 bp langen Abschnitte variiert laut Literatur zwischen 3 und 11 Wiederholungen (Byerley et al. 1993, Vandenberg et al.

1992), so daß die Größe der Amplifikationsprodukte mit den Primern DAT1.for und DAT1.rev zwischen 210 bp und 490 bp liegt (Sano et al. 1993).

Die PCR fand in einem 25 µl Ansatz mit 100 ng DNA, 2,5 µl 10xPCR Puffer, je 200 mM dNTPs, den Primern DAT1.for und DAT1.rev (vgl. 2.1.6), 5% DMSO sowie 2,5 U der AmpliTaq DNA Polymerase statt und wurde im PCR-Gerät nach folgendem Programm inkubiert:

Denaturierung:	3 min	95 °C
für 30 Zyklen:	1 min	95 °C
	40 sec	67 °C
	40 sec	72 °C
letzte Extension:	7 min	72 °C

Die PCR-Produkte wurden auf ein 1,8%iges Agarosegel aufgetragen und die Längen der Fragmente bestimmt.

2.9.6 Der Val81Met RFLP des Tyrosinhydroxylasegens

Amplifiziert wurde ein 215 bp langer DNA-Bereich aus dem zweiten Exon des Tyrosinhydroxylasegens (TH-Gen). Es handelt sich dabei um den BalI RFLP, der zum ersten Mal von Lüdecke und Mitarbeitern (1995) beschrieben wurde und bei dem der Nukleotidaustausch zu einem Aminosäureaustausch der Base +81 von Valin (Val) zu Methionin (Met) führt. Hier wurde das Restriktionsenzym NlaIII zur Darstellung des RFLP verwendet, da dieses Enzym den RFLP direkt in zwei Abschnitte von 128 bp und 87 bp schneidet.

In einem Reaktionsvolumen von 50 µl wurden 200 ng DNA, 5 µl 10x PCR-Puffer, je 10 pmol der Primer TH2.for und TH2.rev (vgl.2.1.6), je 200 mM der vier dNTPs sowie 2,5 U der AmpliTaq DNA Polymerase (Perkin-Elmer, USA) gemischt und wie folgt inkubiert:

Denaturierung:	4 min	95 °C
für 35 Zyklen:	1 min	95 °C
	1 min	65 °C
	1 min	72 °C
letzte Extension:	7 min	72 °C

Ungefähr 1 µg des PCR-Produktes wurden mit 4,5 U des Restriktionsenzym NlaIII für 5-8 Stunden bei 37 °C restringiert und die Fragmente auf einem 3%igen Agarosegel aufgetrennt.

2.9.7 Der -141C Ins/Del-Polymorphismus des D₂-Rezeptorgens

Der -141C Ins/Del-Polymorphismus liegt in der 5'-flankierenden Region des D₂-Rezeptorgens. Es handelt sich um eine funktionelle Insertions-/ Deletionsvariante an der Position -141 im Promotor des Gens, die von Arinami und Mitarbeitern (1997) beschrieben wurde. Zur Darstellung des Polymorphismus wurde ein Bereich aus dem Promotor und dem ersten Exon mit den Primern D2-677 und D2-676 (vgl. 2.1.6) amplifiziert und mit dem Restriktionsenzym BstNI restringiert. Das PCR-Produkt war 304 bp lang. Restringiert wurde das -141C Ins-Allel, so daß sich zwei Fragmente von 160 bp und 144 bp ergaben.

Die PCR wurde mit dem *Expand high fidelity PCR System* von Boehringer Mannheim durchgeführt. In einem Reaktionsvolumen von 50 µl wurden 300 ng DNA, 5 µl 10x PCR-Puffer 2 (Boehringer Mannheim, Mannheim), je 10 pmol der Primer D2-677 und D2-676, je 200 mM der vier dNTPs sowie 0,5 µl des *Expand high fidelity* Enzymmix gemischt und wie folgt inkubiert:

Denaturierung:	1 min	99 °C
für 35 Zyklen:	30 sec	95 °C
	5 min	72 °C
letzte Extension:	7 min	72 °C

Die PCR-Produkte (ca. 1 µg) wurden mit 15 U des Restriktionsenzym BstNI für 5-8 Stunden bei 60 °C restringiert und die Fragmente auf einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt.

2.9.8 Der A-241G-Polymorphismus des D₂-Rezeptorgens

Der A-241G-Polymorphismus befindet sich -241 Basenpaare vor dem Transkriptionsstart der mRNA im 5'-flankierenden Bereich des D₂-Rezeptorgens. Der Polymorphismus läßt sich mit dem spezifischen Enzym MaeIII als RFLP nachweisen. Amplifiziert wurde der gleiche Abschnitt wie für den -141C Ins/Del-Polymorphismus mit den Primern D2-677 und D2-676 (vgl. 2. 1.6). Das PCR-Produkt von 304 bp Länge wurde durch das Enzym beim Auftreten des Guanins in zwei Fragmente von 261 bp und 43 bp restringiert.

Für die PCR wurde das *Expand high fidelity PCR System* von Boehringer Mannheim verwendet. In einem Reaktionsvolumen von 50 µl wurden 300 ng DNA, 5 µl 10x PCR-Puffer 2 (Boehringer Mannheim, Mannheim), je 10 pmol der Primer D2-677 und D2-676, je 200 mM der vier dNTPs sowie 0,5 µl des *Expand high fidelity* Enzymmix gemischt und wie folgt inkubiert:

Denaturierung:	1 min	99 °C
für 35 Zyklen:	30 sec	95 °C
	5 min	72 °C
letzte Extension:	7 min	72 °C

Die PCR-Produkte (ca. 1 µg) wurden mit 2 U des Restriktionsenzym *MaeIII* für 5-8 Stunden bei 55 °C restringiert und die Fragmente auf einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt.

2.10 Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)

Die reverse Transkription von RNA erfolgte in einem 40 µl Ansatz mit 40 mM KCl, 10 mM Tris/HCl (pH 8,3), 1 mg/ml Gelatine, 1,5 mM MgCl₂, 4 mM Dithiothreitol, 6,25 µM des oligo-dT-Primers (Perkin-Elmer), je 0,9 µM der vier dNTPs, 20 U RNase-Inhibitor (Rnasin, Promega) und 400 U reverse Transkriptase (M-MLV RT 200 Units, Promega). Zuerst wurden 4 µg RNA in DEPC-H₂O 10 min bei 70 °C denaturiert, 1 min auf Eis inkubiert und dem Reaktionsgemisch zugefügt. Der Ansatz wurde bei 37 °C für 90 min inkubiert, dann die Reaktion 10 min bei 94°C gestoppt und 2 µl des Ansatzes für die nachfolgende PCR eingesetzt.

2.11 DNA-Sequenzierung

Die angewandte DNA-Sequenzierung beruht auf der von Sanger und Mitarbeitern (1977) entwickelten Kettenabbruchmethode, die von Lee und Mitarbeitern (1992) für die Markierung der DNA mit fluoreszierenden Didesoxynukleotiden am 3'-Ende modifiziert wurde.

Für die Sequenzierung wurden die PCR-Produkte entweder über Agarose-Gelelektrophorese (vgl. 2.7.4) oder durch eine Fällung mit Isopropanol (vgl. 2.7.5) aufgereinigt und für die Sequenzierreaktion verwendet. Für die *Cycle-Sequencing*-Reaktion wurden in einem Ansatz von 20 µl 0,6-1 µg PCR-Produkt, 5 pmol Primer und 4-8 µl des "*Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit*" (Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt) eingesetzt. Die Reaktion erfolgte auf einem OmniGene PCR-Gerät der Firma Hybaid und durchlief 25 Zyklen mit je 15 Sekunden bei 96-98 °C, 15 Sekunden bei der Schmelztemperatur der jeweiligen Primer und 4 min bei 60 °C. Anschließend wurde die DNA mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 4,6) und 2 Volumen 100%igem Ethanol gefällt, mit 70%igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Der Rückstand wurde in 25 µl *Template Suppression*

Reagent (TSR) (Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt) resuspendiert, die Lösung für 2 min bei 90 °C denaturiert und auf Eis aufbewahrt, bis sie zur Analyse in das Gerät gestellt wurde. Die Kapillargelelektrophorese und die Aufnahme der Fluoreszenzsignale erfolgte mit einem automatischen Sequenziergerät (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt).

2.12 Computerauswertung von DNA-Sequenzen

Zum Vergleich der Sequenzdaten wurden die Programme *BLASTN* (Pearson und Lipman, 1988, Pearson 1990, Zheng 1997) für Nukleotidsequenzvergleiche und *BLASTX* (Altschul et al., 1990) für Proteinsequenzvergleiche verwendet. Die Homologievergleiche wurden mit der Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, Bethesda, MD, USA) ausgeführt, welche die *GenBank*, die *DNA DataBank of Japan* (DDBJ, Mishima, Japan), die *Protein DataBank* (PDB) und die *European Molecular Biology Laboratory Nucleotide Sequence Database* (EMBL/EBI, Hinxton, UK) vereint.

Der Sequenzvergleich für die Dopaminrezeptorgene der Ratten wurde mit dem Programm *Sequencher™* (*Gene Codes Corporation*, Ann Arbor, MI, USA) durchgeführt. Die Einzelsequenzen können in diesem Programm geordnet, aneinandergereiht und zu einer Gesamtsequenz vereint werden (= *sequence alignment*).

Die Primer für die Sequenzierung der Dopaminrezeptorgene der Ratten wurden mit Hilfe des Programms *PRIMER3* des *Whitehead Institute for Biomedical Research/MIT Center for Genome Research* ausgewählt.

2.13 Verwendete Datenbanksequenzen für die Sequenzvergleiche der Dopaminrezeptorgene der Ratten

2.13.1 Vergleichssequenz D₁

Für den Vergleich der Sequenzen des Dopaminrezeptorgens D₁ der Ratten wurde die Datenbankeingabe von Zhou und Mitarbeitern (1992) gewählt. Diese Sequenz des Dopaminrezeptorgens D₁ ist 6251 bp lang und umfaßt den größten Teil der Promotorregion, die 5´gelegene untranslatierte Region (5´UTR) der mRNA, die codierende Region mit dem 115 bp langen Intron und die 3´gelegene untranslatierte Region (3´UTR) der mRNA. Die Datenbankeingabe ist im Anhang angegeben. Die Numerierung der Basen wurde aus der Daten-

bank übernommen und zur Positionsangabe der Basenveränderungen nach der Sequenzierung verwendet. Die Klone für die Datenbanksequenz von Zhou und Mitarbeitern (1992) wurden aus einer striatalen cDNA-Phagenbank gezogen, die aus Hirngewebe von Ratten des Stammes Sprague Dawley hergestellt worden war. Es handelte sich daher um eine Sequenz des Dopaminrezeptorgens D_1 von Sprague Dawley Ratten. Diese Sequenz wird im folgenden als Vergleichssequenz D_1 bezeichnet.

2.13.2 Vergleichssequenz D_2

Die Vergleichssequenz für das Dopaminrezeptorgen D_2 der Ratten wurde aus drei Datenbankeingaben zusammengestellt. Für die Promotorregion und den 5'UTR, der von dem ersten Exon kodiert wird, wurden die Eingaben von Wang und Mitarbeitern (1996) und Minowa und Mitarbeitern (1994) gewählt. Die Sequenz für den Abschnitt der mRNA des D_2 -Rezeptorgens wurde von Taylor und Mitarbeitern (1990) in die Datenbank eingegeben. Die Sequenz von Taylor umfaßt einen Teil des 5'UTR der mRNA, die codierende Region und den 3'UTR der mRNA. Die drei Sequenzen konnten über den übereinstimmenden Bereich des 5'UTR aneinandergesetzt werden, so daß für den Sequenzvergleich eine Gesamtsequenz für das Dopaminrezeptorgen D_2 zur Verfügung stand. Die Gesamtsequenz stellt die lange Form des Rezeptors dar, die in der Literatur mit D_{2A} bezeichnet wird. Diese Sequenz wird im folgenden Vergleichssequenz D_2 genannt und ist im Anhang mit der Basennumerierung angegeben. Die kurze Spleißvariante des D_2 -Rezeptorgens ist um 87 bp kürzer und wird mit D_{2B} benannt. Für die Polymorphismen-Untersuchungen wurden die Positionen der Basen im Gen abhängig vom Transkriptionsstart nach Minowa und Mitarbeitern (1994) angegeben. Bei den Ratten, aus denen das Hirngewebe für die Klonierung der drei Sequenzen aus der Datenbank gewonnen worden war, handelte es sich um Ratten vom Stamm Sprague Dawley. Die Vergleichssequenz D_2 ist eine Sequenz des Dopaminrezeptorgens D_2 von Sprague Dawley Ratten.

2.14 Statistische Auswertung der Daten

2.14.1 Statistische Auswertung der Allel- und Genotypenfrequenzen von Patienten und Kontrollprobanden

Die statistische Auswertung der Allel- und Genotypenfrequenzen erfolgte mit Hilfe der Programme Excel und SPSS für Windows.

In den zwei Stichproben der alkoholabhängigen Patienten und der Kontrollprobanden wurde zur Überprüfung der Genotypenfrequenzen (Häufigkeit der Genotypen in einer Stichprobe) mit einem χ^2 -Test geprüft, ob sich die beobachteten Genotypenfrequenzen von den nach dem Hardy-Weinberg Equilibrium erwarteten signifikant unterschieden.

Die Berechnung, ob in der Stichprobe der alkoholabhängigen Patienten ein Genotyp oder ein Allel häufiger vorkam als in der Stichprobe der Kontrollprobanden, erfolgte mittels eines χ^2 -Test. Das Signifikanzniveau wurde als $p \leq 0,05$ definiert. Für den Dopaminrezeptor D_4 wurden die Patienten und Kontrollprobanden nach dem Vorhandensein eines kurzen und langen Allels unterteilt, um den Einfluß der Anzahl der Wiederholungsabschnitte im Gen zu testen. Die Genotypen wurden nach der Anwesenheit oder Abwesenheit des 7er Allels oder in die zwei Gruppen 4/4 versus 4/7 eingeteilt, da physiologische Unterschiede zwischen dem Rezeptor mit den 4er Allelen und dem mit den 7er Allelen berichtet worden sind (van Tol et al., 1992; Asghari et al., 1994). Zusätzlich wurden zwei Gruppen gebildet, von denen die eine Gruppe mindestens ein langes Allel (Allele 6-9 = **L**) aufweisen mußte, die andere Gruppe wies nur kurze Allele (Allele 2-5 = **S**) auf (Benjamin et al. 1996).

2.14.2 Einteilung der untersuchten Probanden auf der Basis der Allele des Dopaminrezeptors D_2 und des Dopamintransporters und statistische Auswertung

Die Patienten und Kontrollprobanden wurden aufgrund der Anwesenheit des Allels A1 des Dopaminrezeptor D_2 TaqI RFLPs (vgl. 2.9.2) und der Anwesenheit des Allels A₉ des Dopamintransporter-Polymorphismus (vgl. 2.9.5) eingeteilt. Das A1 Allel des D_2 -Rezeptorgens wurde schon 1990 von Blum und Mitarbeitern mit der Alkoholabhängigkeit assoziiert (Blum et al., 1990) und das Allel des Dopamintransportergens wurde von Sander und Mitarbeitern (1997) bei Alkoholabhängigen mit vermehrten Krampfanfällen und Delirien assoziiert, so daß die Personen mit beiden Allelen ein höheres Risiko für eine Alkoholabhängigkeit aufweisen sollten.

Es wurden folgende Gruppen gebildet:

- die Patienten und Kontrollprobanden, die bezüglich des D₂-Rezeptorgens kein A1 Allel und bezüglich des VNTRs des DAT1 kein A₉ Allel aufwiesen (**nicht A1 und nicht A₉**)
- die Patienten und Kontrollprobanden, die ein A1 Allel oder ein A₉-Allel aufwiesen (**1 x A1 oder 1 x A₉**)
- die Patienten und Kontrollprobanden, die ein A1 Allel und ein A₉-Allel aufwiesen (**1 x A1 und 1 x A₉**)

Die statistische Auswertung für den Vergleich zwischen den in die Gruppen eingeteilten Patienten und Kontrollprobanden erfolgte mit einem Chi²-Test. Das Signifikanzniveau wurde als $p \leq 0,05$ definiert.

2.14.3 Statistische Auswertung der Assoziationsstudie zwischen den Temperamentsfaktoren und dem Exon III Polymorphismus des D₄-Rezeptorgens

Die statistische Auswertung der Patienten- und Kontrollprobandendaten wurde mit dem Programm SPSS für Windows durchgeführt. Zum Vergleich der Summenwerte der Temperamentsfaktoren der Patienten- und der Kontrollprobandengruppe wurde mit einem t-Test für Mittelwertsvergleiche gerechnet.

Für die Assoziationsstudie wurden die Patienten und Kontrollen aufgrund der Summenwerte der Temperamentsfaktoren eingeteilt. Dazu wurde für jeden Temperamentsfaktor der Median des jeweiligen Summenwertes ermittelt. Die Patienten und Kontrollen wurden für jede Dimension danach unterteilt, ob sie bezogen auf diese Dimension oberhalb (+ entspricht $>$ Median) oder unterhalb (- entspricht \leq Median) des Medians lagen. Daraus ergaben sich 2 verschiedene Typenkonstellationen (Typen: +,-) für die einzelnen Faktoren bei univariater Prüfung, 4 verschiedene Kombinationstypen (Typen: ++, +-, -+, --) für die Kombination zweier Faktoren bei bivariater Analyse und 8 verschiedene Kombinationsmöglichkeiten (mögliche Typen: +++, ++-, +-+, +--, -++-, -+-, --+, ---) aller 3 Faktoren bei trivariater Prüfung. Dann wurde über die Berechnung der *likelihood ratio* ermittelt, ob die gefundene Allelverteilung bezüglich der Einzelfaktoren und ihrer Kombinationen statistisch signifikant von der zufällig zu erwartenden abwich. Für die Persönlichkeitsdimension *persistence* wurden keine Kombinationen mit den anderen Temperamentsdimensionen gerechnet, da es mit dieser Dimension bisher keine Befunde für einen Zusammenhang mit Sucht und Abhängigkeit gibt und die Anzahl der Kombinationen bei der vorhandenen Stichprobe zu groß wäre.

Für diese Tests wurden die Patienten und die Kontrollprobanden in Gruppen danach unterteilt, ob sie

- mindestens ein 7-Allel (**7**) oder kein 7-Allel (**non7**) aufwiesen,
- den Genotyp 4/7 des Allels (**4/7**) oder den Genotyp 4/4 des Allels (**4/4**) aufwiesen,
- mindestens ein langes Allel (> 5 repeats) (**L**) oder kein langes Allel (**S**) (≤ 5 repeats) aufwiesen.

Das Signifikanzniveau wurde jeweils als $p \leq 0,05$ definiert. Bei multipler Testung wurde je nach Anzahl der durchgeführten Tests eine Adjustierung des Signifikanzniveaus nach Bonferroni durchgeführt ($p \leq 0,05/n$).

2.14.4 Statistische Auswertung des Apomorphintests

Die graphische Darstellung des Apomorphintest wurde mit dem Programm Graph Pad Prism und die statistische Auswertung mit dem Programm STATISTIKA durchgeführt.

Zum Vergleich der Hormonkonzentrationen der Patienten und Kontrollprobanden nach Placebo- und nach Apomorphingabe wurde eine Zwei-Wege-ANOVA gerechnet. Dazu wurden die Mittelwerte der Hormonkonzentrationen nach Applikation berechnet und diese zu den Blutabnahmezeitpunkten verglichen. Als Signifikanzniveau wurde $p \leq 0,05$ definiert.

3 Ergebnisse

3.1 Molekularbiologische Untersuchung der Dopaminrezeptorgene D_1 und D_2 von Ratten charakterisiert in einem pharmakologischen Verhaltensmodell

In dieser Arbeit wurden Wistar Ratten verwendet, die anhand der von Havemann und Mitarbeitern (1986) entwickelten Methode nach dem Verhalten charakterisiert worden waren (vgl. 1.5.1). Nach Gabe von 2 mg/kg Apomorphin waren die Tiere in "Nager" und "Schnüffler" eingeteilt worden (vgl. 2.2). Die Gruppe der "Nager" definierte sich durch stereotypes Nagen und gesteigerte lokomotorische Aktivität. Die Gruppe der "Schnüffler" wies stereotypes Schnüffeln auf und zeigte eine extrem erhöhte lokomotorische Aktivität (vgl. Tab. 4). Es wurde hier die Hypothese geprüft, ob es Hinweise gibt, daß die zwei durch eine identische Dosis Apomorphin hervorgerufenen unterschiedlichen Verhaltensweisen der Tiere auf Unterschiede in der DNA-Struktur der Dopaminrezeptorgene D_1 und D_2 zurückzuführen sind. Um dies zu testen wurde die Methode der direkten Sequenzierung gewählt und homologe Bereiche der beiden Gene sequenziert (vgl. 2.11).

3.1.1 Die Strategie zur Sequenzierung der Dopaminrezeptorgene D_1 und D_2

3.1.1.1 Auswahl der Tiere

Von insgesamt 23 im "Animex-Motility-Meter" getesteten Tieren, 13 "Nager" und 10 "Schnüffler", wurden für die Sequenzierung der Dopaminrezeptorgene D_1 und D_2 drei Tiere aus jeder Gruppe ausgewählt, die die Stereotypen am ausgeprägtesten gezeigt hatten (vgl. 2.2.2). Für die Zuordnung der Tiere zu einer der beiden Stereotypieformen mußte eine Mindestpunktzahl von 10 erreicht werden. Alle sechs untersuchten Tiere hatten zwischen 14 und 16 Punkten bei der Einteilung in die entsprechende Gruppe erhalten (vgl. 2.2.2). Mit Hilfe von drei Sequenzierungen pro Verhaltensgruppe konnte dann eine Aussage über die Nukleotidfolge und die Genstruktur der Rezeptorgene gemacht werden, da zwei Sequenzierungen für die Verifizierung eines Unterschieds übereinstimmen mußten.

Da es sich bei den Vergleichssequenzen D_1 und D_2 aus der Datenbank (vgl. Anhang 7.1) um Sequenzen von Sprague Dawley Ratten handelte, wurden zusätzlich noch die entsprechenden Dopaminrezeptorgene von zwei Sprague Dawley Ratten sequenziert, um die Vergleichssequenzen zu bestätigen.

3.1.1.2 Auswahl des Sequenzierbereichs der Rezeptorgene D₁ und D₂

Zur Untersuchung der Dopaminrezeptorgene D₁ und D₂ wurde der Bereich der codierenden Region, die 5'gelegene untranslatierte Region (5'UTR) der mRNA und ein Teil des Promotors gewählt. Der Abschnitt des Promotorbereiches wurde so bestimmt, daß er alle möglichen Transkriptionsfaktorbindungsstellen enthielt, die bei den Genen nachgewiesen worden waren (Zhou et al. 1992, O'Malley et al. 1990, Minowa et al. 1992). In der Tabelle 5 sind die Längen der sequenzierten Bereiche der beiden Gene einander gegenübergestellt, um die Längenunterschiede in den homologen Regionen zu verdeutlichen.

Tab. 5: Längen der sequenzierten Bereiche der Dopaminrezeptorgene D₁ und D_{2A}

Bei dem Rezeptorgen D_{2A} bezeichnet das A die lange Form der Rezeptor-mRNA. Die kurze Form ist um 87 bp kürzer und wird mit D_{2B} abgekürzt (vgl. 2.13.2).

	D ₁ -Rezeptorgen	D _{2A} -Rezeptorgen
sequenzierte Gesamtlänge	2962 bp	2269 bp
Anzahl der sequenzierten PCR-Produkte	7	5
Länge des sequenzierten Promotorbereichs	717 bp	467 bp
Länge des sequenzierten 5'UTR der mRNA	863 bp	349 bp
Länge der codierenden Region	1341 bp	1390 bp

Der ausgewählte Abschnitt des D₁-Rezeptorgens wurde auf genomischer DNA amplifiziert und die Amplifikationsprodukte sequenziert. Für die Sequenzierung der codierenden Region des D₂-Rezeptorgens wurde cDNA aus Gesamt-RNA (vgl. 2.6.2) synthetisiert und diese sequenziert, da für das Gen die Sequenzen der Exon-Intron-Übergänge auf DNA-Ebene nicht bekannt sind. Der Promotorbereich und der 5'UTR der D₂-Rezeptor-mRNA wurden auf genomischer DNA amplifiziert und die PCR-Produkte sequenziert. Die zwei Spleißvarianten des D₂-Rezeptors D_{2A} und D_{2B} (vgl. 1.2.2) wurden mit dem Amplifikationsprodukt RD2.c/d (vgl. 3.1.1.2, 3.1.1.3), in dem das 87 bp lange sechste Exon lag, amplifiziert, die verschieden langen PCR-Produkte wurden über Gelelektrophorese getrennt und sequenziert.

Zur Sequenzierung des Dopaminrezeptorgens D₁ wurden sieben PCR-Produkte, für das Dopaminrezeptorgen D₂ wurden fünf PCR-Produkte amplifiziert, deren Längen zwischen 400 bp und 600 bp lagen.

Sie wurden so plaziert, daß sie sich um 80-150 bp an den Enden überlappten und sich die einzelnen Sequenzierungen über diese gemeinsamen Abschnitte zu der Gesamtsequenz aneinanderfügen ließen (vgl. Abb. 3a,b). Jedes Amplifikat wurde in beiden Richtungen sequenziert.

3.1.1.3 Darstellung der sequenzierten Region der Dopaminrezeptorgene

In den Abbildungen 3.a und 3.b sind die einzelnen Amplifikate und der sequenzierte Bereich der Rezeptorgene D_1 und D_2 schematisch dargestellt. Die Auswahl der sequenzierten Region der Rezeptorgene D_1 und D_2 wurde unter 3.1.1.1 erklärt. Die Längenangaben in Basenpaaren beziehen sich auf die Vergleichssequenz D_1 und auf die Vergleichssequenz D_2 , die im Anhang dieser Arbeit angegeben und unter 2.13.1 und 2.13.2 erläutert werden.

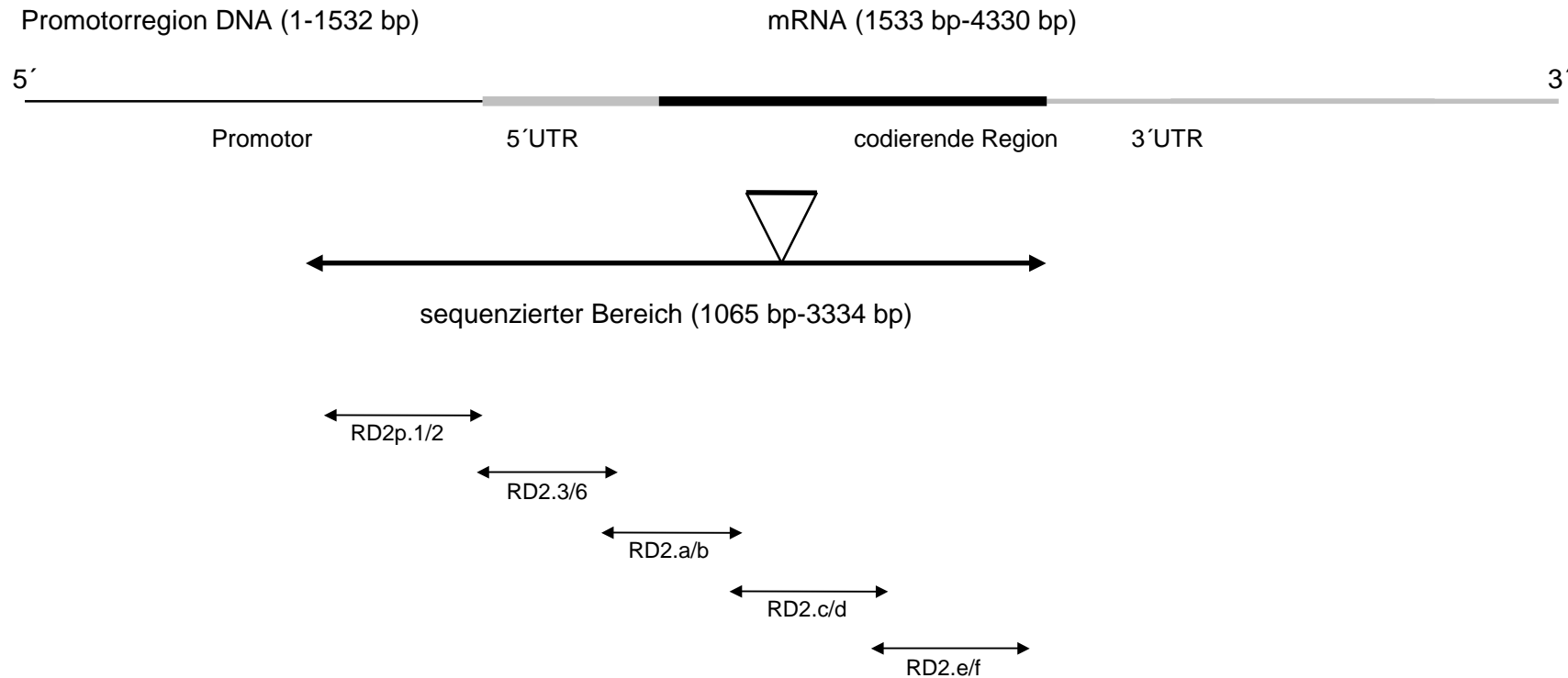


Abb. 3b: Schematische Darstellung des D₂-Rezeptorgens mit dem sequenzierten Bereich und den amplifizierten Teilstücken

Die angegebene Sequenz entspricht der Vergleichssequenz D₂, die aus drei Datenbankeingaben des Dopaminrezeptorgens D₂ zusammengestellt wurde (vgl. 2.13.2 und Anhang). Die amplifizierten Teilstücke sind mit den Namen ihrer Primer bezeichnet. Die Längenangaben sind nach der Vergleichssequenz D₂ in Basenpaaren angegeben. Das Exon, das für die kurze Form der Rezeptor-mRNA herausgespleißt wird, wurde über den sequenzierten Bereich eingezeichnet, da es bei der langen Form mitsequenziert wurde. Die Gesamtlänge des Gens beträgt 4340 bp für D_{2A} und 4253 bp für D_{2B}.

3.1.2 Sequenzanalyse der Dopaminrezeptorgene D_1 und D_2 der "Nager" und "Schnüffler"

Mit den einzelnen Sequenzabschnitten der beiden Dopaminrezeptorgene wurde ein *sequence-alignment* durchgeführt (vgl. 2.12), um die Einzelsequenzen zu der Gesamtsequenz zusammenzufügen und so die drei Gesamtsequenzen der "Nager" mit denen der "Schnüffler" zu vergleichen.

Zwischen den D_1 -Rezeptorgensequenzen der zwei Verhaltensgruppen der "Nager" und "Schnüffler" wurde kein Sequenzunterschied identifiziert. In allen sechs Sequenzierungen des D_1 -Rezeptorgens waren die Sequenzen der "Nager" identisch mit denen der "Schnüffler".

Die sechs Sequenzen des D_2 -Rezeptorgens der "Nager" und "Schnüffler" unterschieden sich in zwei Positionen im Promotorbereich des Gens. "Nager" 1 und "Nager" 2, "Schnüffler" 2 und "Schnüffler" 3 wiesen die gleiche Sequenz auf, die zwei Sequenzunterschiede zu der Vergleichssequenz D_2 zeigte (vgl. 3.1.3). Die Sequenzen von "Nager" 3 und "Schnüffler" 1 waren identisch mit der Vergleichssequenz D_2 .

3.1.3 Die Sequenz des Dopaminrezeptorgens D_1 der "Nager" und "Schnüffler"

Die Sequenzierung der D_1 -Rezeptorgensequenzen der "Nager" und "Schnüffler" sowie der Sprague Dawley Ratten ergab sechs Sequenzunterschiede zu der Vergleichssequenz D_1 aus der Datenbank (vgl. Tab. 6). In der Abbildung 4 ist der Sequenzabschnitt des D_1 -Rezeptorgens abgebildet, in dem sich die Sequenzunterschiede befanden. Dargestellt ist dabei der sequenzierte Bereich des Promotors und der 5'UTR der mRNA des D_1 -Rezeptorgens. Die Sequenzierung von insgesamt acht D_1 -Rezeptorgensequenzen von zwei verschiedenen Rattenstämmen (sechs Sequenzen von Wistar Ratten, zwei Sequenzen von Sprague Dawley Ratten) ergab eine neue Sequenz für den Promotor und den 5'UTR der mRNA des D_1 -Rezeptorgens.

Tab. 6: Unterschiede der Sequenzen des D₁-Rezeptorgens von drei "Nagern", drei "Schnüfflern" und zwei Sprague Dawley Ratten zu der Vergleichssequenz D₁

Die Numerierung der Basen wurde von der aus der Datenbank stammenden Vergleichssequenz D₁ übernommen.

Basennummer	Basen der Vergleichssequenz D ₁	Veränderung	Basen der neuen Sequenz	Region des Gens (Primerpaar)
1901	C/C	Austausch zu G	G/G	Promotor (D1.1/2)
2211	T/T	Deletion eines T		5'UTR (D1.a/b)
2217	C/C	Austausch zu G	G/G	5'UTR (D1.a/b)
2219		Insertion eines C	C/C	5'UTR (D1.a/b)
2678	A/A	Austausch zu G	G/G	5'UTR (D1.c/d)
2854		Insertion eines G	G/G	5'UTR (D1.e/f)

Legende zur Abbildung der nächsten Seite:

Abb. 4: Teilabschnitt des 5'flankierenden Bereichs und des 5'UTR der D₁-Rezeptor mRNA, Gegenüberstellung der Vergleichssequenz D₁ und der neuen Sequenzierung

In der oberen Zeile ist die Vergleichssequenz D₁ aus der Datenbank angegeben, darunter die neue Sequenzierung. Die Unterschiede sind fett gedruckt und unterstrichen. Das 115 bp lange Intron im 5'UTR ist in kleinen Buchstaben gedruckt. Der Transkriptionsstart ist mit +1 markiert.

1851 GCTGGCGCAG GGTGGCAGA ATCCAGGAGC GTGGCCTCCC AGATCGGTGA
1851 GCTGGCGCAG GGTGGCAGA ATCCAGGAGC GTGGCCTCCC AGATCGGTGA

1901 CCACTCTCCA GCCGGGGCTC CCCGTACCCC TGTGCGGGG CACTCAGAGA
1901 GCACTCTCCA GCCGGGGCTC CCCGTACCCC TGTGCGGGG CACTCAGAGA

1951 GAGCGCAGCG ATGCGGGCAG TGTCTTGGGT TAGCAGGGCG TGGGCGTGGG
1951 GAGCGCAGCG ATGCGGGCAG TGTCTTGGGT TAGCAGGGCG TGGGCGTGGG

2001 GAGGGTCGGC TCTGATTCCG AGCTTTGGGT GGAACCTGAG GTTGGCCTGA
2001 GAGGGTCGGC TCTGATTCCG AGCTTTGGGT GGAACCTGAG GTTGGCCTGA

2051 AGAGACGCTG AGTTTTGGTT TACTTGATTT GAGCATCAGG ATTTGTCCCT
2051 AGAGACGCTG AGTTTTGGTT TACTTGATTT GAGCATCAGG ATTTGTCCCT

2101 CGGGTTCTGT CTTGTGCTGG GGTCCCCTGG GGGGCTGAGG TAGCCAGAGA
2101 CGGGTTCTGT CTTGTGCTGG GGTCCCCTGG GGGGCTGAGG TAGCCAGAGA

2151 GGGCACGGAG ATTTGGTAGG CGTCCCACAC CCCTGCTCCA GCTGTGCCTT
2151 GGGCACGGAG ATTTGGTAGG CGTCCCACAC CCCTGCTCCA GCTGTGCCTT

2201 CAGTGAACCA TCGTGTCG_TG TCGCCCGCCA CTCTGCCTGT CAAGCTCAGC
2201 CAGTGAACCA _CGTGTGGCTG TCGCCCGCCA CTCTGCCTGT CAAGCTCAGC

2251 CCACCACCAG GGCCGGGAGG GGACGCGGAG GCGGGGTGGG CTGTGCCCTG
2251 CCACCACCAG GGCCGGGAGG GGACGCGGAG GCGGGGTGGG CTGTGCCCTG

2301 CTGGAACCCA GCCGGCCGGT GCCCTCGCCC AAGCTGCTGT GCTTGCCTGG
2301 CTGGAACCCA GCCGGCCGGT GCCCTCGCCC AAGCTGCTGT GCTTGCCTGG

2351 AGCGCCTGCC ACTGCTAACA GGGAGAGGGT GGCGCCACGG GGAGGCTCAG
2351 AGCGCCTGCC ACTGCTAACA GGGAGAGGGT GGCGCCACGG GGAGGCTCAG
+1

2401 GGTCTTGCCC TAAGAACGAG GAACCAAAGT GGGACCCAGC GCTGGGCTCC
2401 GGTCTTGCCC TAAGAACGAG GAACCAAAGT GGGACCCAGC GCTGGGCTCC

2451 CTCAAACAGG ACAGAAAGCT GCCCCAGTGA CTAGTCCTGG AGGTTCTCT
2451 CTCAAACAGG ACAGAAAGCT GCCCCAGTGA CTAGTCCTGG AGGTTCTCT

2501 CCCAGGAAG CTCTGAGAAC CCTCCCCGGG AGAGGGGACA GCAATCTGTA
2501 CCCAGGAAG CTCTGAGAAC CCTCCCCGGG AGAGGGGACA GCAATCTGTA

2551 GGTGGGCAAG GTAGCAGGAA GGGTACCGCT TCCCTGGATG CCTGGTCTGG
2551 GGTGGGCAAG GTAGCAGGAA GGGTACCGCT TCCCTGGATG CCTGGTCTGG

2601 GATTCTTCC CCAAATCCAT CCCAGAGATT TTTCTGCATC AGGAGGGGAA
2601 GATTCTTCC CCAAATCCAT CCCAGAGATT TTTCTGCATC AGGAGGGGAA

2651 CAGTTGCTAT GCTGACTGGG CTGACTATGG GAGCTCCAGG GGTCTGTTGA
2651 CAGTTGCTAT GCTGACTGGG CTGACTGTGG GAGCTCCAGG GGTCTGTTGA

2701 GAAGTGACCC TAAAGCAAGg taggtggtct tgatggactt gtccaggaga
2701 GAAGTGACCC TAAAGCAAGg taggtggtct tgatggactt gtccaggaga

2751 tgatgcgctg gggttgtgtg tatctaaata tgcggtgtgc acagagtctt
2751 tgatgcgctg gggttgtgtg tatctaaata tgcggtgtgc acagagtctt

2801 ggtgaacgac gttgtctttc cctttgcttt ttagGGCATT TGGAGAGATG
2801 ggtgaacgac gttgtctttc cctttgcttt ttagGGCATT TGGAGAGATG

2851 CGT_GCCAGGG GCTTGGAGGA GAAATGCATG TATTTTAGGC CGTGTCTCAG
2851 CGTGGCCAGGG GCTTGGAGGA GAAATGCATG TATTTTAGGC CGTGTCTCAG

2901 AAAAAGAGGC AGCATCCCTG AAAAGTGA CT AGAATTGACC TGGAAAGAGGC
2901 AAAAAGAGGC AGCATCCCTG AAAAGTGA CT AGAATTGACC TGGAAAGAGGC

3.1.4 Die Sequenz des Dopaminrezeptorgens D₂ der "Nager" und "Schnüffler"

Zwischen den D₂-Rezeptorgensequenzen der "Nager" und "Schnüffler" sowie der Sprague Dawley Ratten traten zwei Unterschiede auf (vgl. Abb. 5, 6). In der Abbildung 6 ist die Sequenz des Promotors des D₂-Rezeptorgens mit den Sequenzunterschieden dargestellt.

In bezug auf die Basen mit den Nummern 1179 und 1277 wurden für das D₂-Rezeptorgen zwei Allele identifiziert (vgl. Abb. 5). "Nager" 1 und 2, ebenso wie "Schnüffler" 2 und 3 waren heterozygot für die Allele, während "Nager" 3, "Schnüffler" 1 und die zwei Sprague Dawley Ratten homozygot für die Allele waren. In den Abbildungen 7a,b sind Beispiele für die direkte Sequenzierung eines homozygoten und eines heterozygoten Tieres dargestellt.

1051	CCCAAGTCTT	CCTCTCAGAA	AGCACAAACAG	CAGAACGAAC	TGCTGTGATT
1051	CCCAAGTCTT	CCTCTCAGAA	AGCACAAACAG	CAGAACGAAC	TGCTGTGATT
1101	TTCAGACCTG	AGGTCTGTAC	ACCGACTCTG	GATATCCTTC	CGGAATCTAT
1101	TTCAGACCTG	AGGTCTGTAC	ACCGACTCTG	GATATCCTTC	CGGAATCTAT
1151	TTCTCCTTTA	AAGACTTGAT	GTACCACATG	TAGTGCTTCA	GCTAGCCCTT
1151	TTCTCCTTTA	AAGACTTGAT	GTACCACA <u>C</u> G	TAGTGCTTCA	GCTAGCCCTT
			<u>I</u>		
1201	GGCCCTGACT	CCTCAAAGGA	GGGGATCGAC	CCGCTGGTGT	TGTGATTGCT
1201	GGCCCTGACT	CCTCAAAGGA	GGGGATCGAC	CCGCTGGTGT	TGTGATTGCT
1251	AGACCAGAGT	AGGTTTGGAT	GGGCAGAGTG	TACTTAAAA	AGTATAGGAT
1251	AGACCAGAGT	AGGTTTGGAT	GGGCAG <u>G</u> GTG	TACTTAAAA	AGTATAGGAT
			<u>A</u>		
1301	GACACCGGCG	AGCAGTCCGG	AGCACAGGCT	ATCCCCACTC	AAAGCCAGAG
1301	GACACCGGCG	AGCAGTCCGG	AGCACAGGCT	ATCCCCACTC	AAAGCCAGAG
1351	ATGGATTCTC	GGTCTCAGCT	CTCAAGGTTT	CTTCCCCAGG	CCCCACAGTG
1351	ATGGATTCTC	GGTCTCAGCT	CTCAAGGTTT	CTTCCCCAGG	CCCCACAGTG
1401	CAGAGATAGT	TCTGGGGCCC	TGGGTGGGTG	GGGCCTCTGT	ACAAGGGGCG
1401	CAGAGATAGT	TCTGGGGCCC	TGGGTGGGTG	GGGCCTCTGT	ACAAGGGGCG
1451	GGGTTCCTCG	GCGCCTCGTG	GCCAGGGTGA	CCCCGCCCCC	TCCTCCTGCG
1451	GGGTTCCTCG	GCGCCTCGTG	GCCAGGGTGA	CCCCGCCCCC	TCCTCCTGCG
				+1	
1501	CAGCGCTCTG	ATTCCGCGGA	GCTGTCCAGC	CT <u>CAGT</u> GCCG	GAGCTGGTCC
1501	CAGCGCTCTG	ATTCCGCGGA	GCTGTCCAGC	CT <u>CAGT</u> GCCG	GAGCTGGTCC
1551	CCTCTTGTGC	GCAGCGCCTC	CTGCCCGCCT	TCCCGCCTGG	TCCCCGCGCT
1551	CCTCTTGTGC	GCAGCGCCTC	CTGCCCGCCT	TCCCGCCTGG	TCCCCGCGCT

Abb. 5: Teilabschnitt des Promotors der Vergleichssequenz D₂ und Gegenüberstellung der D₂-Rezeptorgensequenz der vier Wistar Ratten

In der oberen Zeile ist die Vergleichssequenz D₂ aus der Datenbank angegeben, darunter die neue Sequenzierung. Die Unterschiede sind fett gedruckt und unterstrichen. Der Transkriptionsstart ist mit +1 markiert (Minowa et al., 1994).

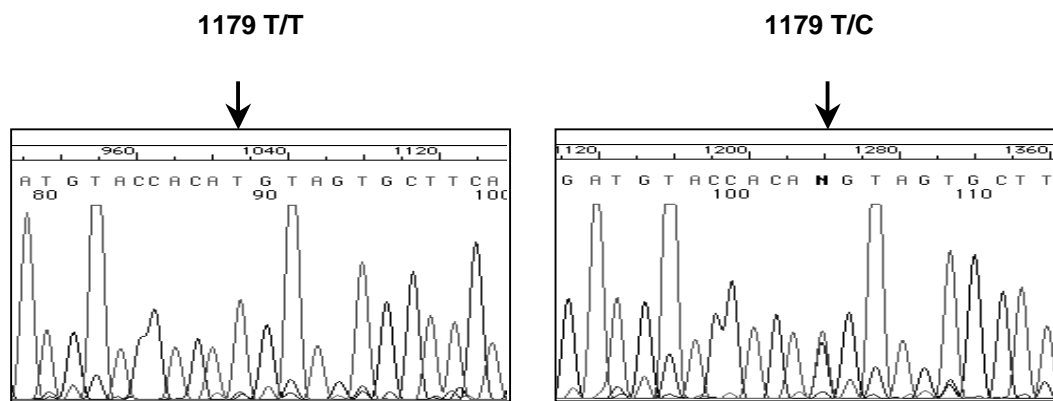


Abb. 6: Direkte Sequenzierung eines homozygoten und eines heterozygoten D₂-Rezeptorgens für den ersten Nukleotidaustausch (Basennummer 1179)

Die Sequenzierungen erfolgten mit dem Primer RD2p.1 und sind vom 5'-Ende des PCR-Produktes zum 3'-Ende dargestellt.

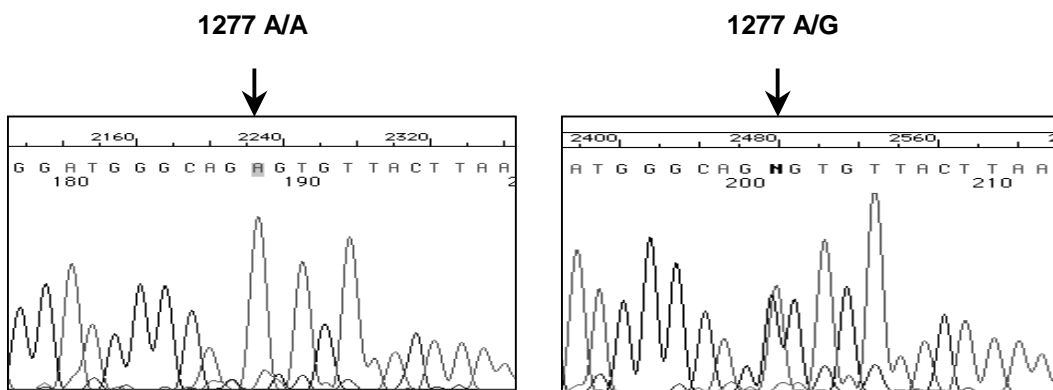


Abb. 7: Direkte Sequenzierung eines homozygoten und eines heterozygoten D₂-Rezeptorgens für den zweiten Nukleotidaustausch (Basennummer 1277)

Die Sequenzierungen erfolgten mit dem Primer RD2p.1 und sind vom 5'-Ende des PCR-Produktes zum 3'-Ende dargestellt.

3.1.5 Identifizierung und Charakterisierung von zwei Polymorphismen in der Promotorregion des D₂-Rezeptorgens von Wistar Ratten

3.1.5.1 Auftreten von zwei Allelen in der Promotorregion des D₂-Rezeptorgens

Die Sequenzierung der Promotorregion des D₂-Rezeptorgens von sechs Wistar Ratten identifizierte Tiere, die an den Positionen -355 (Nummer 1179) und -257 (Nummer 1277) des Gens heterozygot waren. Die zwei Allelformen kamen in vier der sechs Tiere vor. Um zu untersuchen, ob es sich hierbei um echte polymorphe Positionen des D₂-Rezeptorgens handelte, wurde dieser Genabschnitt bei zusätzlich 39 Wistar Ratten sequenziert (Überblick über die Tieranzahl vgl. 2.2.1). Das Ergebnis der Sequenzierung ist in der Tab. 7 wiedergegeben.

Tab. 7: Vorkommen von zwei Allelen im Promotor des D₂-Rezeptorgens von Wistar Ratten

Von insgesamt 45 Tieren (vgl. 2.2.1) wurden die Genotypen für die Polymorphismen an den Positionen -355 und -257 bestimmt. Für jeden Typ ist die Anzahl der Tiere und die Häufigkeit des Typs angegeben.

Typ	Position -355 (1179)	Position -257 (1277)	Anzahl	Häufigkeit
Typ 1 (Datenbank)	T/ T	A/ A	8	17,8 %
Typ 2 (heterozygot)	T/ C	A/ G	23	51,1 %
Typ 3 (homozygot)	C/ C	G/ G	14	31,1 %

Nach diesem Ergebnis wurden drei Genotypen bezüglich der zwei Allele definiert:

- **Genotyp 1:** T-355T A-257A
- **Genotyp 2:** T-355C A-257G
- **Genotyp 3:** C-355C G-257G

In der Abbildung 8 sind Beispiele für die Sequenzierung der drei Genotypen dargestellt.

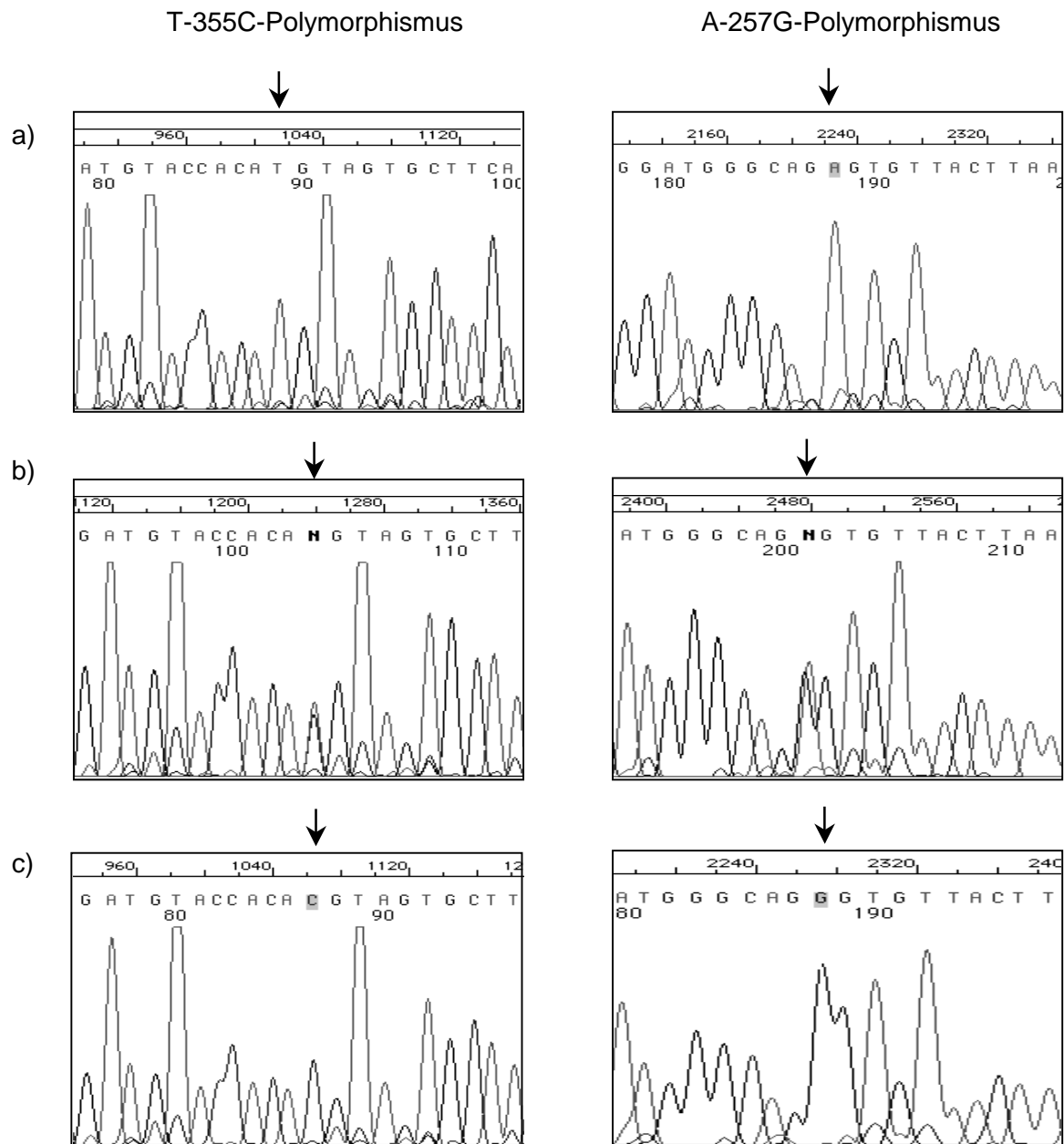


Abb. 8: Sequenzierung der drei Genotypen bezüglich des T-355C-Polymorphismus und des A-257G-Polymorphismus

Die Sequenzierung wurde mit dem Primerpaar RD2p.1/2 durchgeführt (vgl. 2.1.6). Die Leserichtung ist von 5' nach 3' angegeben.

- a) Genotyp 1 (T-355T, A-257A)
- b) Genotyp 2 (T-355C, A-257G)
- c) Genotyp 3 (C-355C, G-257G)

3.1.5.2 Isotypisierung des T-355C-Polymorphismus und des A-257G-Polymorphismus

Für die Isotypisierung der Tiere in bezug auf die beiden Polymorphismen wurde der Genabschnitt mit den Primern RD2p.1/2 amplifiziert und der T-355C-Polymorphismus mit dem Enzym NlaIII (CATG-) nachgewiesen. Das PCR-Produkt ergab ein Fragment von 494 bp. Nach der Restriktion mit Enzym NlaIII blieb das T-355 Allel mit 494 bp erhalten, während das C-355 Allel sich in zwei Fragmente von 116 bp und 378 bp restringieren ließ (vgl. Abb.9).

Die Isotypisierung für den A-257G-Polymorphismus erfolgte mit dem Sequenzierprimer RD2p.22, der innerhalb des mit RD2p.1/2 amplifizierten PCR-Produktes liegt, so daß sich die polymorphe Stelle bei der Sequenzierung in dem Bereich der größten Auflösung befindet.

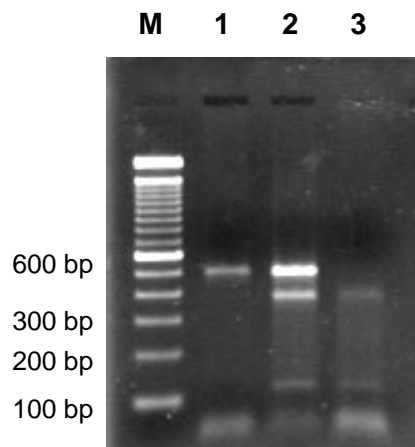


Abb. 9: Gelelektrophoretische Auftrennung der restringierten PCR-Fragmente zur Darstellung des T-355C Polymorphismus

Auftrag der Fragmente nach der Isotypisierung auf einem 2%igen Agarosegel. Die Fragmente wurden mit den Primern RD2p.1/2 für den T-355C amplifiziert und mit NlaIII restringiert. Als Marker (M) diente eine 100-bp Leiter.

Spur 1: T/T ist homozygot für das T-355 Allel (Typ 1)

Spur 2: T/C ist heterozygot für das T-355 und C-355 Allel (Typ 2)

Spur 3: C/C ist homozygot für C-355 Allel (Typ 3)

3.1.6 Auftreten der Polymorphismen im D₂-Rezeptorgen von zwei weiteren Rattenstämmen

Die Genotypen 2 und 3, die bei den sechs Wistar Ratten identifiziert worden waren, traten nur bei Wistar Ratten auf. Die Vergleichssequenz D₂ aus der Datenbank und die Sequenzen der Sprague Dawley Ratten, die für den Sequenzvergleich analysiert worden waren (vgl. 3.1.1), entsprachen dem Genotyp 1. Um festzustellen, ob es sich um zwei für den Stamm Wistar charakteristische Polymorphismen handelte, wurden die Polymorphismen bei zusätzlich 11 Tieren des Stammes Sprague Dawley und 11 Tieren des Stammes PVG untersucht. In der Tabelle 8 sind die Genotypen der Tiere und die Häufigkeit der einzelnen Genotypen angegeben.

Tab. 8: Vorkommen und Häufigkeit der drei Genotypen bei Wistar, PVG, und Sprague Dawley Ratten

Die Tiere, die im Abschnitt 3.5.1 isotypisiert worden waren, wurden zum Vergleich der Tabelle hinzugefügt. Die Isotypisierungen der zwei Sprague Dawley Ratten aus dem Abschnitt 3.1.1.1 wurden ebenfalls mitgezählt. Weitere 11 Sprague Dawley und 11 PVG Ratten wurden neu isotypisiert. Die Genotypen wurden wie unter 3.1.5.1 angegeben bezeichnet.

Rattenstamm	Anzahl	Genotyp 1	Genotyp 2	Genotyp 3
Wistar (m+w)	45	8	23	14
PVG (m)	11	11	-	-
Sprague Dawley (m)	13	10	1	2

Der Genotyp 1 trat bei den PVG Ratten ausschließlich und bei den untersuchten Sprague Dawley Ratten überwiegend auf. Bei den Wistar Ratten waren alle Genotypen vertreten, wobei der Genotyp 2 deutlich häufiger war als beiden anderen Genotypen (vgl. Tab. 8).

3.1.7 Assoziation der Polymorphismen mit unterschiedlicher lokomotorischer Aktivität bei Wistar Ratten

Alle 45 Wistar Ratten waren nach ihrem Verhalten im "Animex-Motility-Meter" charakterisiert worden, so daß die Parameter "vertikale Aktivität", "horizontale Aktivität" und "gelaufene Strecke" (totale Distanz) vorlagen. Es ergab sich eine Assoziation des Verhaltensparameters "gelaufene Strecke" mit den Polymorphismen des D₂-Rezeptorgens (vgl. Abb. 10).

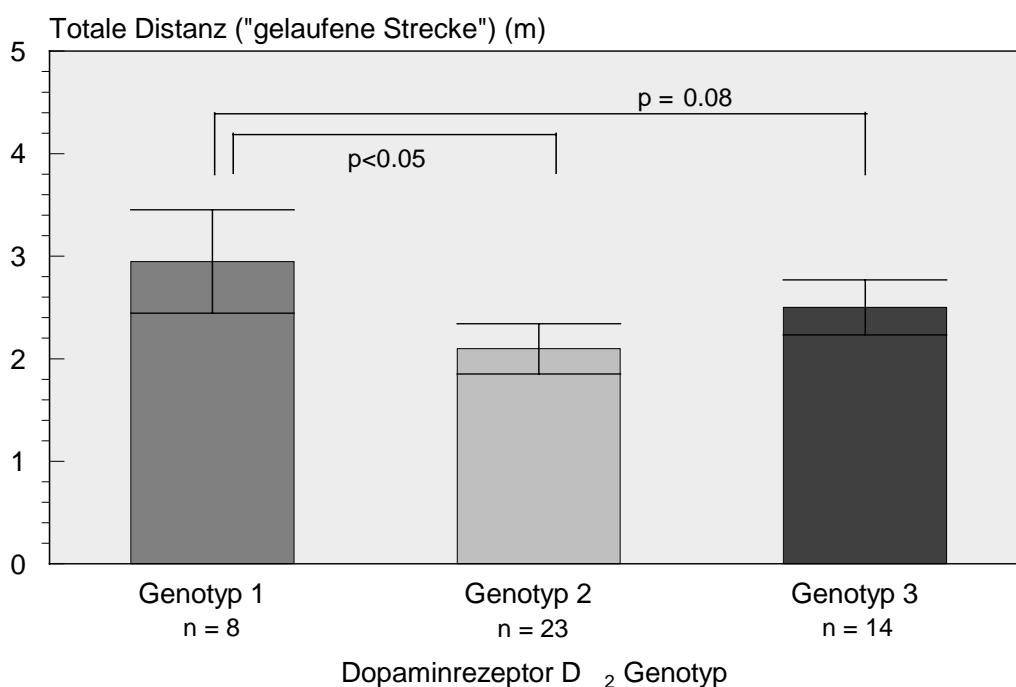


Abb. 10: Parameter "gelaufene Strecke" in Abhängigkeit vom Genotyp der Tiere

Der Parameter wurde für 45 Tiere ausgewertet.

Die Tiere mit dem Genotyp 1 zeigten die höchste lokomotorische Aktivität. Die Tiere mit dem Genotyp 2 wiesen eine geringere lokomotorische Aktivität auf als die Tiere mit dem Genotyp 1. Dieser Unterschied war signifikant auf dem $p \leq 0,05$ Niveau. Weiterhin zeigte sich ein Trend für einen signifikanten Unterschied in dem Parameter "gelaufene Strecke" zwischen den Tieren mit dem Genotyp 1 und dem Genotyp 3 (vgl. Abb. 10). Für die Berechnung der Unterschiede wurde der Mann-Whitney-U-Test gerechnet. Als Signifikanzniveau wurde $p \leq 0,05$ festgelegt.

3.2 Untersuchung der D₂-Rezeptorsensitivität bei alkoholabhängigen Patienten nach Apomorphingabe (Apomorphintest)

Als Test für die Sensitivität von D₂-Rezeptoren in vivo (vgl. 1.5.2) wurde bei Patienten der Apomorphintest (vgl. 2.5) benutzt. Dabei wird die endokrine Reaktion auf den Dopaminrezeptoragonisten Apomorphin als Parameter verwendet, um eine Aussage über die Sensitivität der D₂-Rezeptoren bei alkoholabhängigen Patienten zu treffen. Der Test wurde in dieser Arbeit durchgeführt, da in einigen Studien gezeigt worden war, daß es bei alkoholabhängigen Patienten zu einer abnormalen neuroendokrinen Reaktion auf Apomorphin kommen kann, was mit ihrer D₂-Rezeptorausstattung in Zusammenhang stehen könnte. Es wurden 16 Patienten und 16 Probanden mit Apomorphin getestet und die Hormonspiegel von Somatotropin (GH), Prolaktin (PRL) und Cortisol gemessen. Parallel dazu wurden von 31 der Testpersonen die D₂-Rezeptorpolymorphismen TaqI A, A-241G und -141C Ins/Del analysiert.

3.2.1 Neuroendokrine Reaktionen nach Apomorphingabe

Die Hormonreaktionen von GH, Prolaktin und Cortisol der Patienten und der Kontrollen sind in den Abbildungen 11a-c dargestellt. Die Hormonkonzentrationen waren für die Patienten- und Kontrollprobandengruppe bei Placebobehandlung und für GH auch bei Apomorphingabe nach Beurteilung der Kurven nicht unterschiedlich. Für Prolaktin wurden die Hormonkonzentrationen nach dem Vergleich der Kurven der Patienten und Kontrollen zu den verschiedenen Zeitpunkten statistisch verglichen, da die Kurven einen Unterschied nahelegten (Faktor 1 "Pat/Kontr" $F_{(1,22)} = 1,126$, n.s.; Faktor 2 "Zeit" $F_{(14,308)} = 22,717$, $p \leq 0.000$; 1×2 $F_{(14,308)} = 0,955$, n.s.). Für Cortisol ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten zu den Zeitpunkten 10.00 Uhr, 10.15 Uhr und 10.30 Uhr, der mit einer Zwei-Wege-ANOVA berechnet wurde (Faktor 1 "Pat/Kontr" $F_{(1,28)} = 1,024$, n.s.; Faktor 2 "Zeit" $F_{(14,392)} = 17,824$, $p \leq 0.000$; 1×2 $F_{(14,392)} = 5,791$, $p \leq 0.000$).

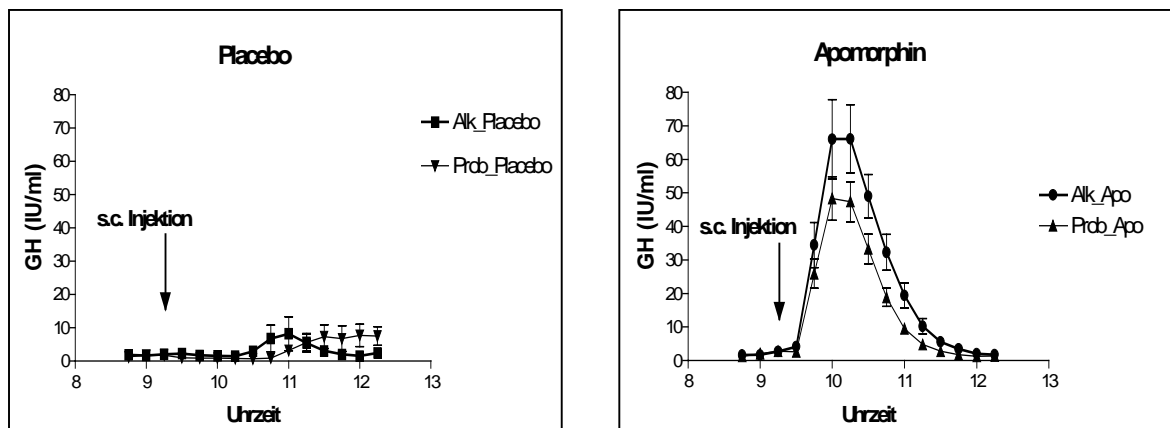


Abb. 11a: Serumkonzentrationen von GH vor und nach Placebo- und Apomorphingabe für beide Stichproben.

Die Apomorphingabe betrug 0,01 mg/kg Körpergewicht. Angegeben sind die Mittelwerte mit dem Standardfehler des Mittelwertes (Patienten n = 16; Kontrollen n = 16)

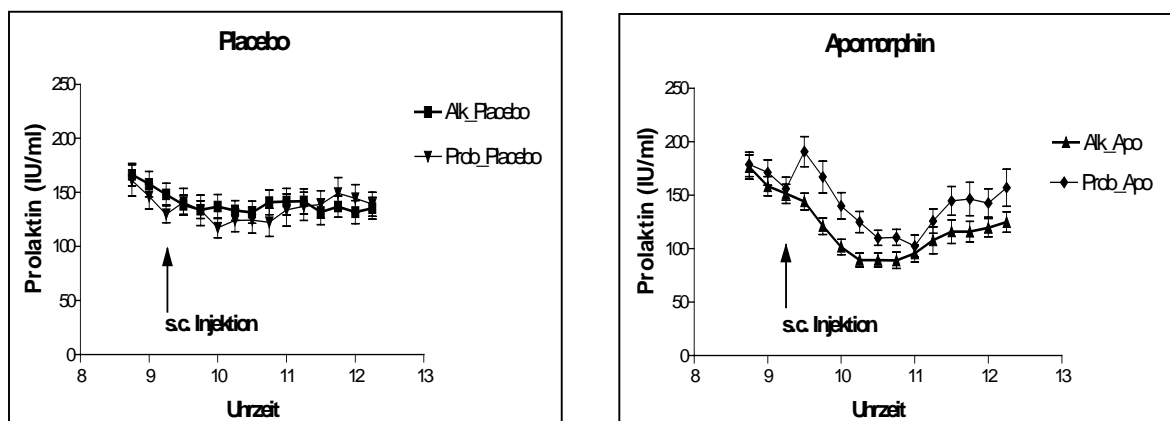


Abb. 11b: Serumkonzentrationen von Prolaktin vor und nach Placebo- und Apomorphingabe für beide Stichproben.

Die Apomorphingabe betrug 0,01 mg/kg Körpergewicht. Angegeben sind die Mittelwerte mit dem Standardfehler des Mittelwertes (Patienten n = 16; Kontrollen n = 10).

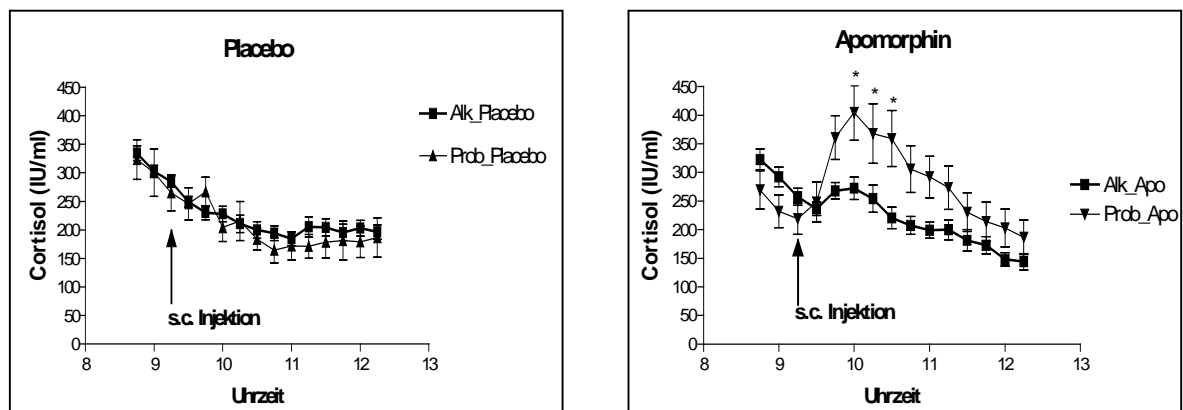


Abb. 11c: Serumkonzentrationen von Cortisol vor und nach Placebo- und Apomorphingabe für beide Stichproben.

Die Apomorphingabe betrug 0,01 mg/kg Körpergewicht. Angegeben sind die Mittelwerte mit dem Standardfehler des Mittelwertes (Patienten n = 16; Kontrollen n = 16). Die Sterne geben die signifikant unterschiedlichen Mittelwerte zwischen den Patienten und Kontrollen an (2-Wege-ANOVA).

3.2.2 Genotypen und Allelfrequenzen von drei Polymorphismen des D₂-Rezeptorgens und neuroendokrine Reaktion auf Apomorphin

In unseren Stichproben von 16 alkoholabhängigen Patienten und 16 Kontrollprobanden wurden die Polymorphismen A-241G, -141C Ins/Del und TaqI A des D₂-Rezeptorgens untersucht (vgl. 2.9.7 und 2.9.8) und mit ihrer endokrinen Reaktion nach dem Apomorphintest in Beziehung gesetzt.

3.2.2.1 Genotypen und Allelfrequenzen

Insgesamt 31 Probanden wurden für die RFLPs (Restriktions-Längenfragment-Polymorphismen) A-241G und TaqI A (vgl. 2.9.2 und 2.9.8) und den funktionellen Polymorphismus -141C Ins/Del isotypisiert. Bei dem funktionellen Polymorphismus -141C Ins/Del führt die Deletionsvariante zu einer verminderten Expression des Gens. (Arinami et al., 1997). Die Häufigkeiten der Allele und Genotypen der drei Polymorphismen sind in den folgenden Tabellen angegeben.

Tab. 9a: Allelzahl und Allelfrequenzen des Dopaminrezeptorgens D₂ bei alkoholabhängigen Patienten und Kontrollprobanden

Die Allelfrequenzen sind in Klammern in Prozent (%) angegeben.

	Allel 1	Allel 2	p-Wert (chi ²)
D₂/ A-241G	A-241	G-241	
Patienten (2n = 30)	28 (93,33)	2 (6,67)	
Kontrollen (2n = 32)	30 (93,75)	2 (6,25)	0,947
D₂/ -141C Ins/Del	-141C Ins	-141C Del	
Patienten (2n = 30)	30 (100)	-	
Kontrollen (2n = 32)	29 (90,63)	3 (9,37)	0,086
D₂/ TaqI A	A1	A2	
Patienten (2n = 32)	8 (25,0)	24 (75,00)	
Kontrollen (2n = 32)	3 (9,38)	29 (90,62)	0,098

Tab. 9b: Genotypenanzahl und Genotypenfrequenzen des Dopaminrezeptorgens D₂ bei alkoholabhängigen Patienten und Kontrollprobanden

Die Genotypenfrequenzen sind in Klammern in Prozent (%) angegeben.

	Genotyp	Genotyp	Genotyp	p-Wert (chi ²)
D₂/ A-241G	A-241A	A-241G	G-241G	
Patienten (n = 15)	13 (86,67)	2 (13,33)	-	
Kontrollen (n = 16)	14 (87,50)	2 (12,50)	-	0,998
D₂/-141C Ins/ Del	-141C Ins/Ins	-141C Ins/Del	-141C Del/Del	
Patienten (n = 15)	15 (100)	-	-	
Kontrollen (n = 16)	13 (81,25)	3 (18,75)	-	0,222
D₂/ TaqI A	A1/A1	A1/A2	A2/A2	
Patienten (n = 16)	1 (6,25)	6 (37,50)	9 (56,25)	
Kontrollen (n = 16)	-	3 (18,75)	13 (81,25)	0,29

Die beobachtete Verteilung der Allele und Genotypen unterschied sich nicht von der nach dem Hardy-Weinberg-Equilibrium erwarteten Verteilung. Zwischen den Gruppen der Patienten und Probanden konnte kein signifikanter Unterschied in der Allel- bzw. Genotypenverteilung beobachtet werden. Allerdings zeigte sich ein schwacher Trend für einen Unterschied der Gruppen bei der Allelverteilung der Polymorphismen TaqI A und -141C Ins/Del (vgl. Tab.9a).

3.2.2.2 Apomorphinreaktionen in Abhängigkeit vom D₂-Rezeptorgenotyp

Um die Auswirkung der Genotypen auf die Apomorphinreaktion zu beschreiben, wurden die Hormonspiegelmessungen der Patienten und Probanden einzeln aufgetragen. Es wurden die Hormonspiegel der 4 Personen mit den Genotypen TaqI A1/A1 und -141C Ins/Del mit den Hormonspiegeln der 27 anderen Personen verglichen. In Bezug auf das A1 Allel weisen mehrere Befunde darauf hin, daß die Träger des A1 Allels eine verringerte Rezeptorsensitivität und Dichte besitzen (Heinz et al., 1995; Lawford et al., 1992; Noble et al., 1995). Die Betrachtung des -141C Ins/Del Polymorphismus erschien interessant, da von Arinami und Mitarbeitern (1997) die verminderte Expression des D₂-Rezeptorgens in vitro nachgewiesen wurde. Die hier beobachteten Hormonreaktionen entsprachen der pharmakologischen Wirkung von Apomorphin, wobei sie bei den einzelnen Probanden sehr unterschiedlich ausfielen. Durch Apomorphin wurde wie erwartet die GH- und die Cortisol-Sekretion stimuliert, während die Prolaktin-Sekretion vermindert wurde (vgl. 1.5.2).

In den folgenden Abbildungen 12a-c ist zu erkennen, daß die Genotypen keinen Einfluß auf die Hormonspiegel der drei Hormone GH, PRL und Cortisol hatten. Der Proband mit dem Genotyp TaqI A A1/A1 und die drei Probanden mit dem Genotyp -141C Ins/Del unterschieden sich in ihren Reaktionen auf Apomorphin nicht von den anderen Probanden.

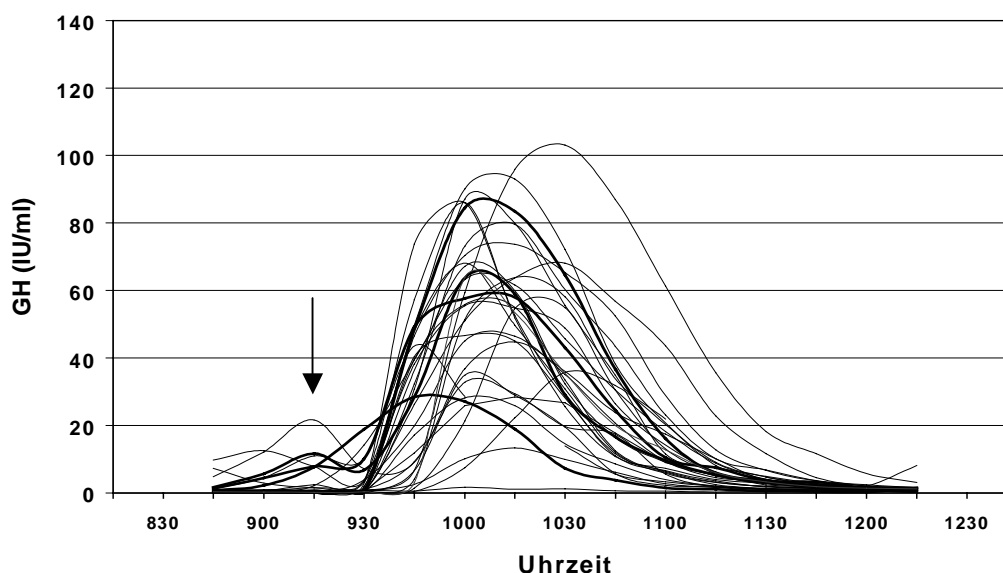


Abb. 12a: Individuelle GH-Spiegel der getesteten Probanden

Die Hormonprofile wurden aus den Blutkonzentrationen von GH ermittelt, die im Abstand von 15 min vor und nach Gabe von Apomorphin gemessen wurden. Apomorphin wurde um 9.15 Uhr appliziert (↓). Die Profile sind für die untersuchten 31 Probanden einzeln aufgetragen. Die Hormonprofile der 4 Probanden mit den Genotypen TaqI A A1/A1 und -141C Ins/Del sind mit dicken schwarzen Linien dargestellt.

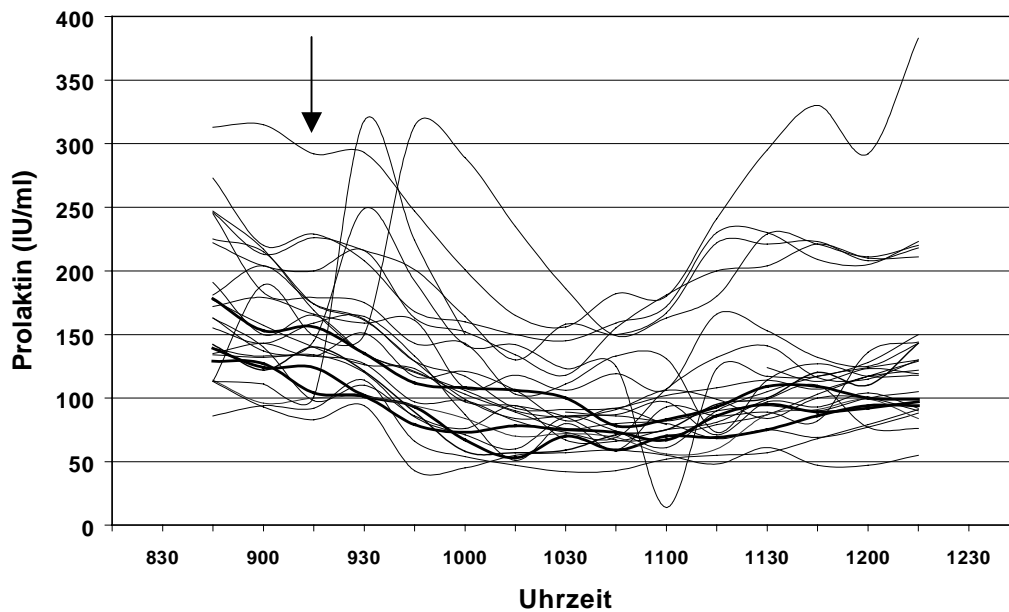


Abb. 12b: Individuelle Prolaktinspiegel der getesteten Probanden

Die Hormonprofile wurden aus den Blutkonzentrationen von Prolaktin ermittelt, die im Abstand von 15 min vor und nach Gabe von Apomorphin gemessen wurden. Apomorphin wurde um 9.15 Uhr appliziert (↓). Die Profile sind für die untersuchten 31 Probanden einzeln aufgetragen. Die Hormonprofile der 4 Probanden mit den Genotypen TaqI A A1/A1 und -141C Ins/Del sind mit dicken schwarzen Linien dargestellt.

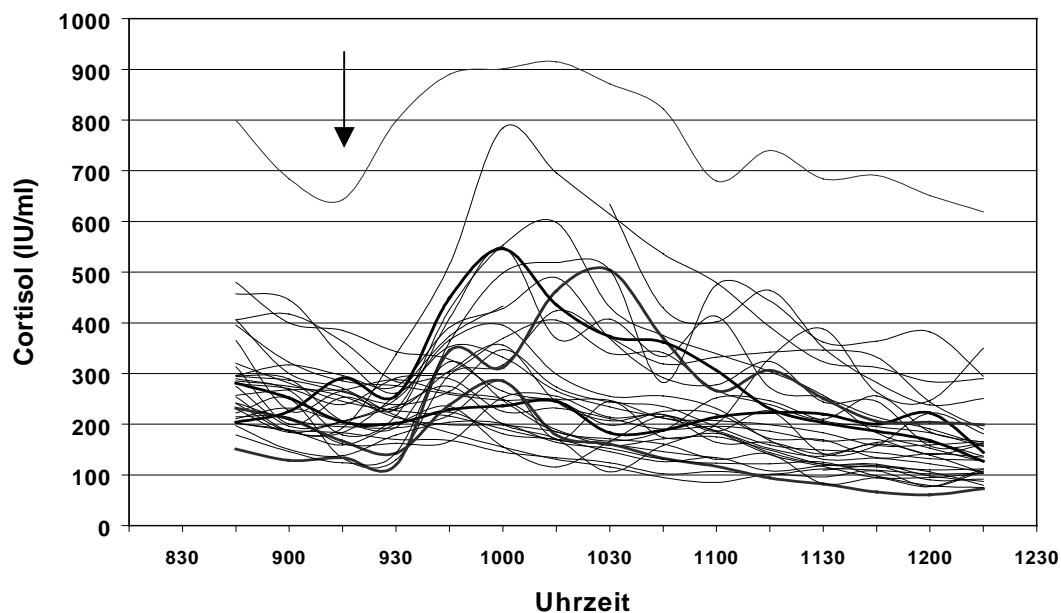


Abb. 12c: Individuelle Cortisolspiegel der getesteten Probanden

Die Hormonprofile wurden aus den Blutkonzentrationen von Cortisol ermittelt, die im Abstand von 15 min vor und nach Gabe von Apomorphin gemessen wurden. Apomorphin wurde um 9.15 Uhr appliziert (↓). Die Profile sind für die untersuchten 31 Probanden einzeln aufgetragen. Die Hormonprofile der 4 Probanden mit den Genotypen TaqI A A1/A1 und -141C Ins/Del sind mit dicken schwarzen Linien dargestellt.

3.3 Untersuchung von DNA-Sequenz-Polymorphismen des dopaminergen Systems bei alkoholabhängigen Patienten und Kontrollprobanden

Um die Hypothese zu testen, ob Polymorphismen des dopaminergen Systems bei alkoholabhängigen Patienten mit der Alkoholabhängigkeit assoziiert sind, wurden DNA-Sequenz-Polymorphismen der Dopaminrezeptorgene D_1 , D_2 , D_3 , D_4 , sowie der Tyrosinhydroxylase und des Dopamintransportergens bestimmt. Bei den Patienten lag eine Alkoholabhängigkeit nach den diagnostischen Kriterien des DSM-IV (vgl. 2.3.1) vor. Bei den Kontrollprobanden handelte es sich um gesunde Personen, die wie unter 2.3.3 erläutert ausgesucht worden waren. In beiden Gruppen wurden die Genotypenverteilung und die Allelfrequenzen der Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLP) Bsp1286I für das Rezeptorgen D_1 , TaqI A für das Rezeptorgen D_2 , MscI für das Rezeptorgen D_3 und Val81Met für das Tyrosinhydroxylasegen ermittelt. Für das Dopaminrezeptorgen D_4 und das Dopamintransportergen wurden Polymorphismen mit variabler Anzahl an Wiederholungsabschnitten (*variable number of tandem repeats* = VNTR) bestimmt. Bei dem Polymorphismus des D_4 -Rezeptorgens handelte es sich um einen Polymorphismus mit 48 bp langen Wiederholungsabschnitten (48bp-repeat-Polymorphismus). Für das Transportergen wurde ein Polymorphismus mit 40 bp langen Wiederholungsabschnitten (40bp VNTR) untersucht.

3.3.1 Genotypen und Allelfrequenzen der Polymorphismen der Dopaminrezeptorgene D_1 , D_2 , D_3 und des Tyrosinhydroxylasegens

Die Genotypenverteilung und die Allelfrequenzen der RFLPs der Dopaminrezeptorgene D_1 , D_2 , D_3 und des Tyrosinhydroxylasegens (TH) beider Gruppen sind in den folgenden Tabellen aufgeführt. Bei den RFLPs werden drei Genotypen unterschieden, die entsprechend der relevanten Fachliteratur benannt und abgekürzt wurden (vgl. Tab. 10). Die Allelfrequenzen der beiden Allele wurden ebenfalls ermittelt. Die Genotypen und Allelfrequenzen wurden mit den unter 2.9 beschriebenen Methoden bestimmt. In den Abbildungen 13-15 sind Beispiele für die Gelelektrophorese zur Auswertung der Isotypen der vier RFLPs gegeben.

Tab. 10: Benennung der Polymorphismen, Allele und Genotypen der RFLPs

Die Polymorphismen wurden nach dem jeweiligen Restriktionsenzym bezeichnet. Die Allele wurden entsprechend der Literatur benannt, wobei das ungeschnittene Allel mit 1 und das geschnittene Allel mit 2 angegeben wurde. Die Genotypen ergaben sich aus den drei möglichen Allelkombinationen. Die Angaben in Klammer geben die Position des Polymorphismus im Gen an, sofern diese bekannt ist.

Gen	Polymorphismus	Allelbezeichnung	Genotypen
D ₁ -Rezeptorgen	Bsp1286I (+1403)	D1, D2	D1/D1, D1/D2, D2/D2
D ₂ -Rezeptorgen	TaqI A	A1, A2	A1/A1, A1/A2, A2/A2
D ₃ -Rezeptorgen	MscI /BclI (+9)	M1, M2	M1/M1, M1/M2, M2/M2
TH-Gen	Val 81 Met (+81)	Val, Met	Val/Val, Val/Met, Met/Met

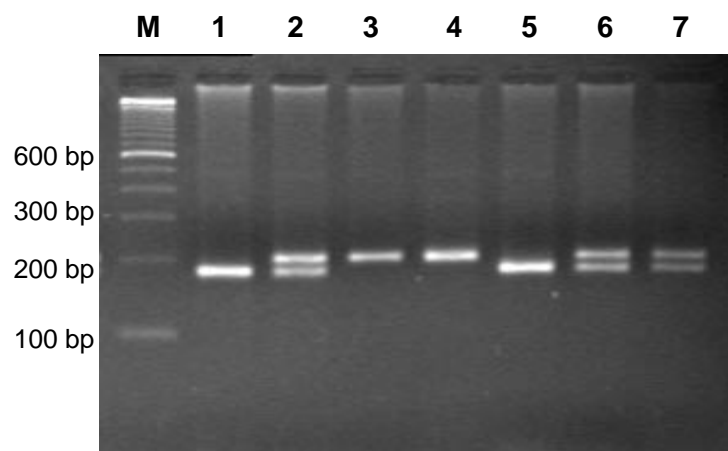


Abb. 13: Genotypisierung für den Bsp1286I Polymorphismus des Dopaminrezeptorgens D₁

Auftrag der PCR-Fragmente nach der Restriktion mit Bsp1286I auf einem 4%igen Agarosegel. Als Marker (M) wurde eine 100 bp-Leiter verwendet.

- Spuren 3, 4: Beispiele für den homozygoten Genotyp D1/D1
- Spuren 2, 6, 7: Beispiele für den heterozygoten Genotyp D1/D2
- Spuren 1, 5: Beispiele für den homozygoten Genotyp D2/D2

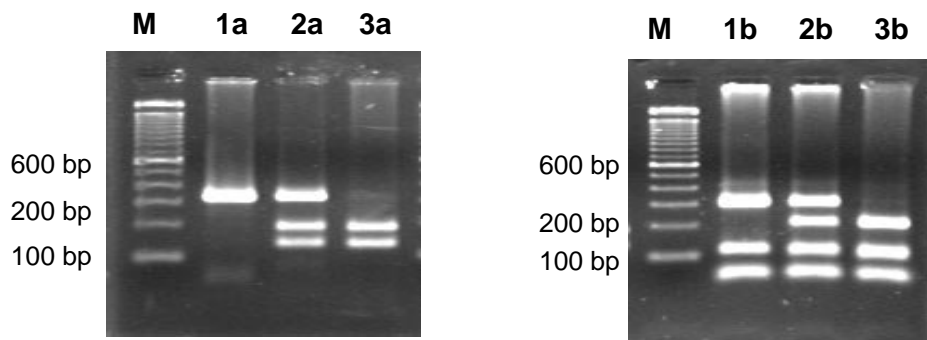


Abb. 14: Genotypisierung für den TaqI A und den MscI Polymorphismus der Dopaminrezeptorgene D₂ und D₃.

Auftrag der PCR-Fragmente nach der Restriktion mit TaqI bzw. MscI auf einem 1,8%igen Agarosegel. Als Marker (M) wurde eine 100 bp-Leiter verwendet.

- Spuren 1a, 1b: Beispiel für die homozygoten Genotypen A1/A1, M1/M1
- Spuren 2a, 2b: Beispiel für die heterozygoten Genotypen A1/A2, M1/M2
- Spuren 3a, 3b: Beispiel für die homozygoten Genotypen A2/A2, M2/M2

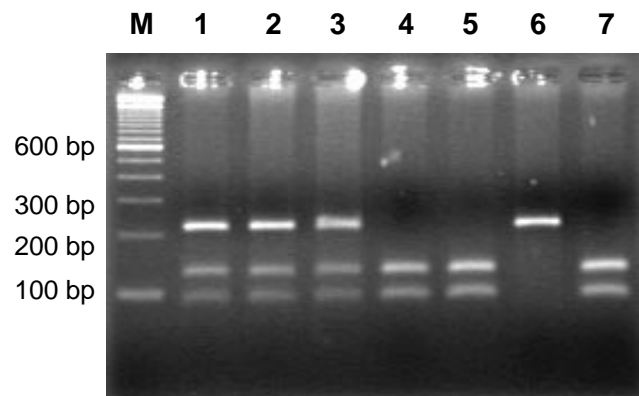


Abb. 15: Genotypisierung für den Val81Met-Polymorphismus des Tyrosinhydroxylasegens.

Auftrag der PCR-Fragmente nach der Restriktion mit NlaIII auf einem 3%igen Agarosegel. Als Marker (M) wurde eine 100 bp-Leiter verwendet.

- Spur 6: Beispiel für den homozygoten Genotyp Val/Val
- Spuren 1, 2, 3: Beispiele für die heterozygoten Genotypen Val/Met
- Spuren 4, 5, 7: Beispiele für die homozygoten Genotypen Met/Met

Tab. 11a: Genotypenanzahl und -frequenzen der RFLPs der Dopaminrezeptorgene D₁, D₂, D₃ und des Tyrosinhydroxylasegens bei alkoholabhängigen Patienten und Kontrollprobanden

Die Frequenzen der Genotypen sind in Klammern in Prozent (%) angegeben.

	Genotyp	Genotyp	Genotyp	p-Wert (chi ²)
D₁/ Bsp1286I	D1/D1	D1/D2	D2/D2	
Patienten (n = 159)	52 (32,70)	87 (54,72)	20 (12,58)	
Kontrollen (n = 97)	39 (40,21)	48 (49,48)	10 (10,31)	0,561
D₂/ TaqI A	A1/A1	A1/A2	A2/A2	
Patienten (n = 244)	13 (5,33)	76 (31,15)	155 (63,52)	
Kontrollen (n = 97)	3 (3,09)	31 (31,96)	63 (64,95)	0,761
D₃/ MscI	M1/M1	M1/M2	M2/M2	
Patienten (n = 160)	80 (50,00)	68 (42,50)	12 (7,50)	
Kontrollen (n = 97)	44 (45,36)	43 (44,33)	10 (10,31)	0,679
TH/ Val81Met	Val/Val	Val/Met	Met/Met	
Patienten (n = 161)	78 (48,44)	68 (42,24)	15 (9,32)	
Kontrollen (n = 97)	45 (46,39)	33 (34,02)	19 (19,59)	0,0518

Die beobachteten Genotypenfrequenzen in der Gruppe der alkoholabhängigen Patienten unterschieden sich für die Dopaminrezeptorgene D₁ D₂ und D₃ sowie für das Tyrosinhydroxylasegen nicht signifikant von denen, die nach dem Hardy-Weinberg Equilibrium erwartet wurden. In der Kontrollgruppe waren die Genotypenfrequenzen für die drei Dopaminrezeptorgene ebenfalls nicht unterschiedlich von den nach Hardy-Weinberg erwarteten Frequenzen.

Aufgrund eines Trends zu einem Ungleichgewicht im Hardy-Weinberg-Equilibriums für den Val81Met-Polymorphismus des Tyrosinhydroxylasegens in der Kontrollgruppe ergaben sich auch in den weiteren Auswertungen Trends für einen Unterschied zwischen den Patienten und den Kontrollen bezüglich des Val81Met Polymorphismus (vgl. Tab. 11a). Diese Trends wurden nicht weiter interpretiert, da die Bonferroni-Korrektur angewendet wurde und die Abweichung durchaus mit dem Zufall vereinbar ist.

Tab. 11b: Allelzahl und -frequenzen der RFLPs der Dopaminrezeptorgene D₁, D₂, D₃ und des Tyrosinhydroxylasegens bei alkoholabhängigen Patienten und Kontrollprobanden

Die Allelfrequenzen sind in Klammern in Prozent (%) angegeben.

	Allel 1	Allel 2	p-Wert (chi ²)
D₁ / Bsp1286I	D1	D2	
Patienten (2n = 318)	191 (60,06)	127 (39,94)	
Kontrollen (2n = 194)	126 (64,95)	68 (35,05)	0,269
D₂ / TaqI A	A1	A2	
Patienten (2n = 488)	102 (20,90)	386 (79,10)	
Kontrollen (2n = 194)	37 (19,07)	157 (80,93)	0,593
D₃ / MscI	M1	M2	
Patienten (2n = 320)	228 (71,25)	92 (28,75)	
Kontrollen (2n = 194)	131 (67,53)	63 (32,47)	0,372
TH/ Val81Met	Val	Met	
Patienten (2n = 322)	224 (69,57)	98 (30,43)	
Kontrollen (2n = 194)	123 (63,40)	71 (36,60)	0,128

3.3.2 Genotypen und Allelfrequenzen des Exon III Polymorphismus des Dopaminrezeptorgens D₄

Die in den untersuchten Stichproben von 244 alkoholabhängigen Patienten und 97 Kontrollprobanden beobachteten Genotypen und Allelfrequenzen des Exon III Polymorphismus des D₄-Rezeptorgens sind in der folgenden Tabelle 12 angegeben. Die Anzahl der 48bp-Wiederholungen lag in den Stichproben von Patienten und Kontrollen zwischen 2 und 9 Wiederholungen. Aus der Anzahl der Wiederholungen, ergaben sich auch die unten aufgeführten Genotypenbezeichnungen, bei denen die Zahl der Wiederholungen der beiden Allele angegeben wurde. Die Genotypenfrequenzen der Patienten und der Kontrollen unterschieden sich nicht signifikant von denen, die nach dem Hardy-Weinberg Equilibrium erwartet wurden.

Tab. 12: Allel- und Genotypenanzahl und Frequenzen des Exon III Polymorphismus des Dopaminrezeptorgens D₄ bei alkoholabhängigen Patienten und Kontrollprobanden

Die Allelbezeichnungen beziehen sich auf die Anzahl der 48 Basenpaarwiederholungen. Die Allel- und Genotypenfrequenzen sind in Klammern in Prozent (%) angegeben. Die Angaben für die häufigsten Allele (4er, 7er Allel) und Genotypen (4/4, 4/7) sind fett geschrieben, da zwischen diesen Allel- bzw. Genotypenverteilungen am häufigsten Unterschiede zwischen Gruppen gezeigt worden waren (Ebstein et al., 1996, Benjamin et al., 1996).

Dopaminrezeptorgen D ₄	Patienten (n = 244)	Kontrollen (n = 97)
Allele (repeats)		
2	46 (9,43)	15 (7,73)
3	20 (4,10)	12 (6,19)
4	313 (64,14)	133 (68,56)
5	2 (0,41)	3 (1,55)
6	2 (0,41)	0
7	101 (20,70)	29 (14,95)
8	1 (0,20)	1 (0,51)
9	3 (0,61)	1 (0,51)
Genotypen		
2/2	3 (1,23)	0
2/3	1 (0,41)	1 (1,03)
2/4	24 (9,84)	10 (10,3)
2/7	14 (5,74)	4 (4,12)
2/8	1 (0,41)	0
3/3	0	1 (1,03)
3/4	15 (6,15)	7 (7,22)
3/7	4 (1,64)	2 (2,06)
4/4	102 (41,8)	46 (46,93)
4/5	2 (0,82)	3 (3,09)
4/6	2 (0,82)	0
4/7	65 (26,64)	20 (20,62)
4/8	0	1 (1,03)
4/9	1 (0,41)	0
7/7	8 (3,28)	1 (1,03)
7/9	2 (0,82)	1 (1,03)

Zwischen den Genotypenfrequenzen der Patienten und der Kontrollen gab es keinen signifikanten Unterschied (*likelihood ratio* $p = 0,381$). Auch der Vergleich zwischen den Gruppen mit den Genotypen 4/4 vs. 4/7 ergab keinen signifikanten Unterschied (*likelihood ratio* $p = 0,187$).

Im Anschluß ist in der Abbildung 16 die Genotypisierung von 12 Probanden für den Exon III Polymorphismus exemplarisch dargestellt.

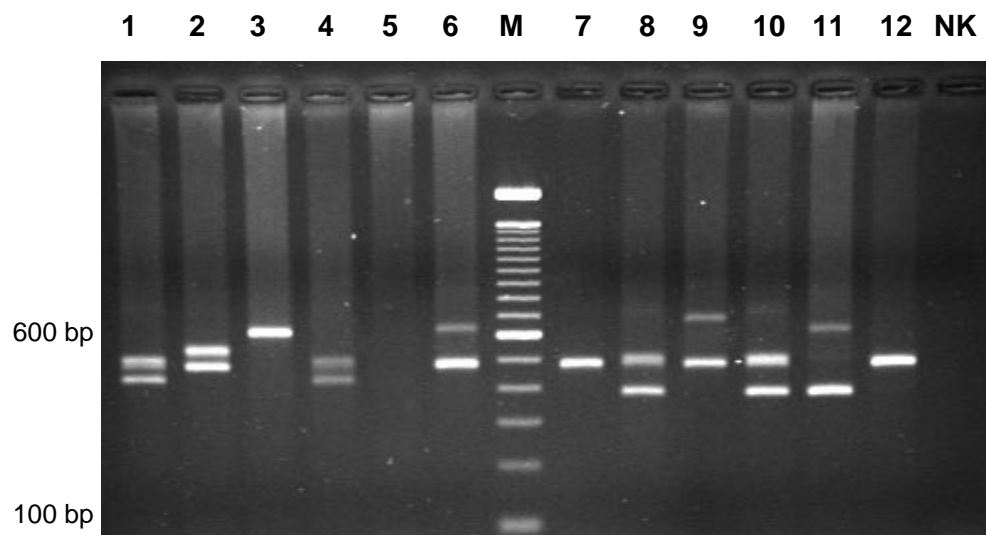


Abb. 16: Gelelektrophoretische Darstellung einiger Genotypen für den Exon III Polymorphismus des D₄-Rezeptorgens

Auftrag der PCR-Produkte auf einem 1,8%igen Agarosegel, als Marker diente eine 100 bp-Leiter.

Spuren 1, 4:	Genotyp 3/4	Spuren 8, 10:	Genotyp 4/4
Spur 2:	Genotyp 4/5	Spuren 7, 12:	Genotyp 4/4
Spur 3:	Genotyp 7/7	Spur 9:	Genotyp 4/8
Spur 6:	Genotyp 4/7	Spur 11:	Genotyp 2/7

Die dritte Bande in den Spuren 1 und 4 sind auf Heteroduplexmoleküle zurückzuführen, die langsamer wandern als die Homoduplexbanden.

Mit Hilfe der Unterteilung nach langen und kurzen Allelen kann der Einfluß der Länge des Wiederholungsabschnittes auf die Beteiligung des Exon III Polymorphismus an der Alkoholabhängigkeit untersucht werden. Die Unterteilung der 244 Patienten und 97 Kontrollprobanden in zwei Gruppen nach der Länge des Wiederholungsbereiches (short = S (≤ 5 repeats) und long = L (> 5 repeats)) wurde gemäß dem Vorschlag von Benjamin und Mitarbeitern (1996) vorgenommen. Es ergaben sich folgende Gruppengrößen für die Unterteilung in **S vs. L**:

Patientengruppe mit mindestens einem langen Allel (> 5 repeats):	n = 97	(39,75 %)
Patientengruppe ohne ein langes Allel (≤ 5 repeats):	n = 147	(60,25 %)
Kontrollgruppe mit mindestens einem langen Allel (> 5 repeats):	n = 29	(29,9 %)
Kontrollgruppe ohne ein langes Allel (≤ 5 repeats):	n = 68	(70,1 %)

Es ergab sich nach dieser Unterteilung kein signifikanter Unterschied zwischen den Stichproben der Patienten und Kontrollen (*likelihood ratio* $p = 0,196$), der auf eine Beteiligung des Exon III Polymorphismus an der Ätiologie der Alkoholabhängigkeit schließen läßt.

3.3.3 Genotypen und Allelfrequenzen des VNTR des Dopamintransportergens DAT1

In der hier untersuchten Stichprobe von 160 Patienten und 97 Kontrollprobanden kamen die Allele des 40bp VNTR Polymorphismus des Dopamintransportergens mit 6, 9, 10 oder 11 Wiederholungen vor. In der Abbildung 17 ist ein Beispiel für die Auftrennung der Amplifikationsprodukte (vgl. 2.9.5) des Polymorphismus dargestellt.

Die Genotypenverteilung der Patienten und Kontrollen unterschieden sich für den VNTR nicht von der nach dem Hardy-Weinberg-Equilibrium erwarteten Verteilung.

Der Vergleich zwischen den Stichproben der alkoholabhängigen Patienten und den Kontrollen ergab keinen signifikanten Unterschied in der Genotypenverteilung (*likelihood ratio* $p = 0,204$). Die Allel- und Genotypenfrequenzen sind in der folgenden Tabelle 13 angegeben.

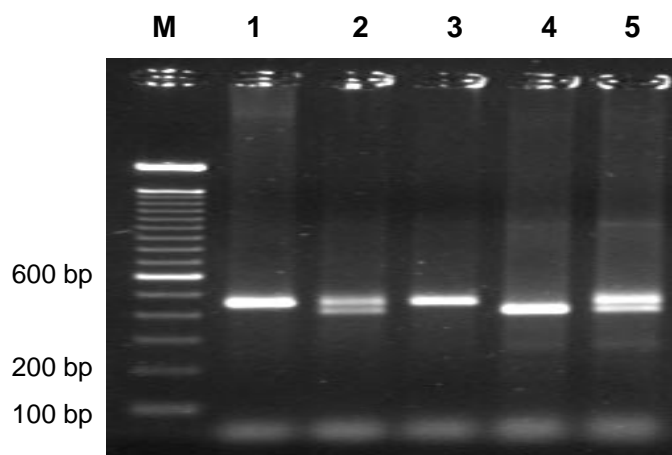


Abb. 17: Gelelektrophoretische Darstellung einiger Genotypen für den 40bp VNTR Polymorphismus des Dopamintransportergens DAT1

Auftrag der PCR-Produkte auf einem 1,8%igen Agarosegel, als Marker diente eine 100 bp-Leiter.

Spuren 1, 3: Beispiele für den Genotyp 10/10

Spuren 2, 5: Beispiele für den Genotyp 9/10

Spur 4: Beispiel für den Genotyp 9/9

Tab. 13: Allel- und Genotypenanzahl und Frequenzen des VNTR Polymorphismus des Dopamintransportergens bei alkoholabhängigen Patienten und Kontrollprobanden

Die Allel- und Genotypenfrequenzen sind in Klammern in Prozent (%) angegeben. Die Allele sind mit der Anzahl der Wiederholungen des 40 bp Abschnittes bezeichnet.

Dopamintransportergen	Patienten (n = 160)	Kontrollen (n = 97)
Allele		
6	1 (0,31)	0
9	76 (23,75)	58 (29,90)
10	243 (75,94)	135 (69,59)
11	0	1 (0,51)
Genotypen		
6/9	1 (0,63)	0
9/9	6 (3,75)	7 (7,22)
9/10	63 (39,37)	44 (45,36)
10/10	90 (56,25)	45 (46,39)
10/11	0	1 (1,03)

3.3.4 Unterschiede in der Genotypenverteilung nach Einteilung der alkoholabhängigen Patienten in Typ I und Typ II nach Cloninger

Die alkoholabhängigen Patienten wurden wie unter 2.3.2 angegeben nach der Theorie von Cloninger (1987) in zwei Subtypen eingeteilt. Es wurde die Hypothese geprüft, ob die Genotypenverteilung zwischen den beiden Gruppen (Typ I vs. Typ II) der alkoholabhängigen Patienten unterschiedlich war. Die Gesamtanzahl der alkoholabhängigen Patienten, von denen eine Charakterisierung nach Cloninger vorlag, betrug für die große Stichprobe 126 von insgesamt 160 Patienten, und für die kleine Stichprobe 34 von insgesamt 83 Patienten (vgl. 2.3.1). Im folgenden ist die Einteilung der Patienten in die beiden Gruppen nach Cloninger und die gefundene Genotypenverteilung angegeben:

Tab. 14: Genotypenverteilung der sechs untersuchten Polymorphismen nach der Einteilung der Patienten in Typ I und Typ II nach Cloninger

Die Genotypen der RFLPs wurden in der folgenden Reihenfolge angegeben: D₁/D₁, D₁/D₂, D₂/D₂ für das D₁-Gen; A₁/A₁, A₁/A₂, A₂/A₂ für das D₂-Gen; M₁/M₁, M₁/M₂, M₂/M₂ für das D₃-Gen; Val/Val, Val/Met, Met/Met für das TH-Gen. Für den DAT1 Polymorphismus wurden die Genotypen in der Reihenfolge 10/10, 9/10, 9/9, 9/6 angegeben. Für die Einteilung bezüglich des Exon III Polymorphismus in S. vs. L. vgl. 2.14.3.

Einteilung der Patienten (ges. 126 Patienten)	D ₁ Bsp1286I	D ₃ MscI	DAT1 40bp repeat	TH Val81Met
	Genotypen	Genotypen	Genotypen	Genotypen
Typ I (62 Patienten)	23/ 32/ 7	31/ 29/ 2	36/ 22/ 3/ 1	32/ 26/ 4
Typ II (64 Patienten)	19/ 37/ 7	32/ 25/ 6	36/ 26/ 1/ 0	28/ 29/ 7
p-Wert (chi ² likelihood ratio)	0,692	0,302	0,430	0,541

Einteilung der Patienten (ges. 160 Patienten)	D ₂ TaqI A	D ₄ Exon III S. vs. L.
	Genotypen	Genotypen
Typ I (82 Patienten)	3/ 21/ 58	55/ 27
Typ II (78 Patienten)	5/ 23/ 50	53/ 25
p-Wert (chi ² likelihood ratio)	0,580	0,906

Bei einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ waren die beiden Gruppen (Typ I vs. Typ II) der Patienten bezüglich der Genotypenverteilung für keinen Polymorphismus signifikant unterschiedlich. Für den Exon III Polymorphismus des D₄-Rezeptors wurden die Patienten wie unter 3.3.2 angegeben nach dem Vorkommen eines langen Allels eingeteilt, um die Einwirkung der Länge des Wiederholungsbereiches abschätzen zu können. Auch hier unterschieden sich die Patienten in den beiden Gruppen nicht signifikant voneinander. Der Vergleich der Genotypenfrequenzen zwischen den Kontrollen und den Patienten aus den zwei Gruppen zeigte sich ebenfalls nicht signifikant.

3.3.5 Assoziationsstudie mit dem TaqI A Polymorphismus des D₂-Rezeptorgens und dem VNTR des Dopamintransportergens und der Alkoholabhängigkeit

Für diese Assoziationsstudie wurden die Patienten wie unter 2.14.2 erläutert nach den Allelen des TaqI A Polymorphismus des D₂-Rezeptorgens und des 40bp VNTR des Dopamintransportergens eingeteilt, da diese Polymorphismen in früheren Studien mit der Alkoholabhängigkeit in Zusammenhang gebracht worden waren. Es ergaben sich dadurch drei Gruppen mit kombinierten „Genotypen“, von denen der Typ 2 bei den alkoholabhängigen Patienten am häufigsten vorkommen sollte, da dieser definierte Typ die Allele vereinigt, für die eine Assoziation mit der Alkoholabhängigkeit nachgewiesen worden war (Blum et al., 1990, Sander et al., 1997). Die Einteilung in die Genotypen und die Anzahl der Patienten und Probanden ist in der folgenden Tabelle angegeben:

Tab. 15: Einteilung der alkoholabhängigen Patienten und Kontrollen bezüglich der Allele des TaqI A Polymorphismus des D₂-Rezeptorgens und des 40-bp VNTR Polymorphismus des Dopamintransportergens

	Anzahl Patienten	Anzahl Probanden
kombinierter Typ 0 (nicht A1 und nicht A ₉)	65 (32,5%)	28 (28,9%)
kombinierter Typ 1 (1 x A1 oder 1 x A ₉)	112 (56,0%)	53 (54,6%)
kombinierter Typ 2 (1 x A1 und 1 x A ₉)	23 (11,5%)	16 (16,5%)
Anzahl in den Gruppen	200 (100%)	97 (100%)

Die Einteilung der alkoholabhängigen Patienten und Probanden in Gruppen mit kombinierten „Genotypen“ bezüglich des D₂-Rezeptorgens und des Dopamintransportergens ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen der Patienten und der Kontrollprobanden. Der p-Wert (*likelihood ratio*) für diesen Test betrug $p = 0,473$ ($df = 2$). Die Hypothese, daß der „Genotyp“ 2 am häufigsten innerhalb der Gruppe der Patienten auftrat, konnte nicht bestätigt werden.

3.4 Assoziationsstudie mit den Temperamentsfaktoren des TCI und dem Exon III Polymorphismus (48 bp repeat) des D4-Rezeptorgens

In dieser Assoziationsstudie diente der Exon III Polymorphismus (48 bp repeat) als genetischer Marker, um eine mögliche allele Assoziation mit den Persönlichkeitsdimensionen aus dem Temperament- und Charakter-Inventar (TCI) nachzuweisen (vgl. 2.4). Es wurde die Hypothese getestet, ob das 7er Allel des D₄-Rezeptorgens eine Anfälligkeit für eine Ausprägung einer Temperamentsdimension oder einer Kombination von Temperamentsdimensionen verleiht, die bei Alkoholabhängigen häufig bzw. typisch sind. Dazu wurden zuerst die Probanden in Gruppen in bezug auf die Prävalenz des 7er Allels eingeteilt und die Summenwerte der Persönlichkeitsdimensionen gebildet. Anschließend wurde für den Test auf eine allele Assoziation die *likelihood ratio* berechnet.

3.4.1 Einteilung der Probanden und Gruppengrößen

Die Genotypen und Allelfrequenzen des Exon III Polymorphismus des D₄-Rezeptorgens sind unter 3.3.2 angegeben. Von den 244 Patienten bzw. den 97 Probanden, bei denen der Exon III Polymorphismus bestimmt worden war, waren von 145 Patienten und 63 Probanden die vollständigen Daten zur Berechnung der Summenwerte von allen vier Persönlichkeitsfaktoren ermittelt worden. Demnach ergaben sich die in der folgenden Tabelle angegebenen Gruppengrößen bei der Einteilung in bezug auf die Prävalenz des 7er Allels des Exon III Polymorphismus (vgl. 2.14.3).

Tab. 16: Einteilung der Probanden in drei Gruppen bezüglich ihres D₄-Rezeptor Genotyps und Größe der Gruppen

Die Gruppeneinteilung ist unter 2.14.3 angegeben.

Gruppen	nicht7	1x7	ges.	4/4	4/7	ges.	S	L	ges.
Patienten	94	51	145	65	34	99	93	52	145
Probanden	44	19	63	31	12	43	44	19	63

3.4.2 Summenwerte der Persönlichkeitsfaktoren

Als zweites wurden die Summenwerte der Persönlichkeitsfaktoren *novelty seeking* (NS), *harm avoidance* (HA), *reward dependence* (RD) und *persistence* (P) berechnet. Daraus ergaben sich folgende Mittelwerte (\pm Standardabweichung), Mediane und Spannweiten der Summenwerte für die einzelnen Persönlichkeitsfaktoren bei den Patienten (n = 145) und Probanden (n = 63) (vgl. Tab. 16).

Tab. 17: Mittelwerte (\pm Standardabweichung (SD)), Mediane und Spannweiten der Summenwerte für die Temperamentsdimensionen des TCI

Angegeben sind die Werte für 145 Patienten und 63 Probanden.

Temperamentsdimensionen	Patienten			Kontrollen		
	Mittelwert (\pm SD)	Median	Spannweite	Mittelwert (\pm SD)	Median	Spannweite
<i>novelty seeking</i>	20,8 \pm 5,4	20	10-60	17,7 \pm 5,2	17	5-32
<i>harm avoidance</i>	14,8 \pm 4,3	15	6-29	12,1 \pm 5,3	12	1-26
<i>reward dependence</i>	13,7 \pm 3,5	14	5-36	11,5 \pm 3,6	11	4-23
<i>persistence</i>	3,0 \pm 1,4	3	0-7	2,7 \pm 1,8	2	0-6

Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied beim Vergleich der Mittelwerte für den Temperamentsfaktor *harm avoidance* zwischen den Summenwerten (Mittelwerte) der Kontrollprobanden und der Patienten (t-Test; t = 3,487; df = 99,901; p < 0,001; CI 95% [1,14; 4,15]).

3.4.3 Assoziation zwischen dem Exon III Polymorphismus (48 bp repeat) des D₄-Rezeptorgens und den Persönlichkeitsdimensionen

Für die Assoziationsstudie wurde für jeden Patienten und Probanden bestimmt, ob der Summenwert seiner vier Temperamentsfaktoren *novelty seeking*, *harm avoidance* und *reward dependence* oberhalb (+) oder unterhalb (-) des Medians der Gesamtpopulation lag, und die sich daraus ergebenden Typenkonstellationen einzeln und in Kombination geprüft (vgl. 2.14.3). Bei dieser Analyse wurde keine signifikante Assoziation zwischen dem Exon III Polymorphismus in allen Gruppierungen und einem der Temperamentsfaktoren *novelty seeking*, *harm avoidance*, *reward dependence* und *persistence* gefunden, wenn man die Faktoren univariat prüfte. Aufgrund multipler Tests wurde das Signifikanzniveau nach Bonferroni korrigiert ($p \leq 0,05/n$), so daß es statistisch nicht zu einem signifikanten Zusammenhang kam. Bei der Prüfung von Kombinationen aus 2 oder 3 Faktoren, konnte keine signifikante Assoziation mit dem Exon III Polymorphismus gefunden werden (vgl. Tab. 18). Die schwache Assoziation der Kombination *novelty seeking* und *reward dependence* ist bei dem adjustierten Signifikanzniveau nicht signifikant und kann nicht als echter Befund gewertet werden.

Tab. 18: Gerechnete Tests für die Assoziation des Exon III Polymorphismus mit einem einzelnen Temperamentsfaktor und einer Kombination der Temperamentsfaktoren (eingeteilt nach dem Median der Summenwerte)

Angegeben sind die Werte für die *likelihood ratio*. Das Signifikanzniveau wurde nach Bonferroni für multiples Testen adjustiert (adjustiertes Signifikanzniveau $p \leq 0,006$). Fettgedruckt sind die Werte, die im weiteren diskutiert werden, obwohl sie nach dem adjustierten Niveau nicht signifikant waren.

Temperamentsdimensionen	7 vs. nicht7		4/4 vs. 4/7		S vs. L	
	Pat.	Kontr.	Pat.	Kontr.	Pat.	Kontr.
<i>novelty seeking</i>	0,48	0,46	0,17	0,047	0,38	0,46
<i>harm avoidance</i>	0,91	0,85	0,17	0,16	0,75	0,85
<i>reward dependence</i>	0,39	0,05	0,49	0,56	0,28	0,05
<i>persistence</i>	0,99	0,85	0,20	0,28	0,89	0,85
<i>novelty seeking</i> und <i>harm avoidance</i>	0,89	0,13	0,15	0,108	0,79	0,13
<i>novelty seeking</i> und <i>reward dependence</i>	0,74	0,009	0,55	0,037	0,70	0,009
<i>harm avoidance</i> und <i>reward dependence</i>	0,56	0,024	0,24	0,035	0,62	0,024
<i>novelty seeking</i> und <i>harm avoidance</i> und <i>reward dependence</i>	0,74	0,016	0,21	0,048	0,75	0,016

4 Diskussion

Die Untersuchung genetischer Varianten von einzelnen Elementen des Zentralnervensystems (ZNS) spielen in der neurobiologischen und pharmakologischen Forschung eine immer größere Rolle. Dabei werden Hinweise auf pharmakologische Faktoren erwartet, die mit dem Auftreten psychischer Störungen assoziiert sind. In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe von verschiedenen molekularbiologischen Ansätzen individuell unterschiedliches Verhalten und genetische Veränderungen im dopaminergen System im Tiermodell und bei alkoholabhängigen Patienten untersucht.

Das apomorphininduzierte Verhalten in dem von Havemann und Mitarbeitern (1986) entwickelten Tiermodell diente in dieser Arbeit zur Charakterisierung zweier spezifischer Phänotypen von Wistar Ratten. Dabei konnten die zwei verschiedenen stereotypen und lokomotorisch unterschiedlichen Verhaltensweisen anhand des Modells eindeutig unterschieden werden. Eine unterschiedliche genetische Struktur der Dopaminrezeptoren D_1 und D_2 , über die Apomorphin wirkt, wurde als mögliche Ursache für das unterschiedliche Verhalten der Tiere angesehen. Veränderungen in der genetischen Struktur von Rezeptorgenen wurden in letzter Zeit beispielsweise für eine unterschiedliche Expression der Gene oder die Änderungen in der Bindungsaffinität der Rezeptorproteine verantwortlich gemacht (Arinami et al., 1997, Lesch et al., 1996; Smeraldi et al., 1998). Im ersten Teil der Arbeit konnten neue genetische Varianten der zwei Dopaminrezeptorgene D_1 und D_2 der Ratten identifiziert werden. Mit zwei Varianten im Promotor des D_2 -Rezeptorgens konnten drei Genotypen bei den Ratten unterschieden und mit dem Laufverhalten der Tiere im "Animex-Motility-Meter" assoziiert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden genetische Varianten im dopaminergen System bei 244 alkoholabhängigen Patienten und 97 passenden, gesunden Kontrollen untersucht. Eine Assoziation der untersuchten Polymorphismen der Dopaminrezeptorgene, des Dopamintransporters und der Tyrosinhydroxylase mit der Erkrankung der Alkoholabhängigkeit konnte nicht dargestellt werden. Dieser Befund paßt zu der kontroversen Diskussion über die Assoziation des dopaminergen Systems mit der Alkoholabhängigkeit in der neueren Literatur (Heinz et al., 1996; Jönsson et al., 1997; Sander et al., 1997; Vandenberg et al., 1997), die weiterhin geführt wird (Noble et al., 1998; Gelernter & Kranzler, 1999). Dabei brachten Assoziationsstudien auf der Suche nach Genen, die an der Ätiologie einer Erkrankung beteiligt sind, für AIDS (Dean et al., 1996; Samson et al., 1996), die Myoklone Dystonie (Klein et al., 1999) oder die Sichelzellanämie (Pauling et al., 1949) die entscheidenden Hinweise zur Identifizierung der involvierten Gene.

Die differenziertere Charakterisierung der Probanden mit dem Temperament- und Charakter-Inventar von Cloninger (1987) und dem Apomorphintest war ein weiteres Verfahren, die Ätiologie des Alkoholismus zu untersuchen. Hier ergab sich ein Hinweis für einen Zusam-

menhang einzelner Persönlichkeitsmerkmale mit der Alkoholabhängigkeit, und es zeigten sich Unterschiede in der Apomorphinreaktion zwischen Patienten und Kontrollen.

Die vorliegende Arbeit hatte zum einen das Ziel, die Rolle des dopaminergen Systems für individuell unterschiedliches Verhalten im Tiermodell von apomorphinstimulierten Ratten zu untersuchen. Im zweiten Teil war die Absicht, bei alkoholabhängigen Patienten und gesunden Probanden Assoziationen genetischer Varianten des dopaminergen Systems mit der Alkoholabhängigkeit sowie mit Persönlichkeitsmerkmalen und pharmakogenen Faktoren zu identifizieren.

4.1 Tierexperimentelle Untersuchungen - lokomotorisches Verhalten von Ratten nach Stimulation mit Apomorphin

In dieser Arbeit wurden genetische Untersuchungen bezüglich apomorphininduzierter Verhaltensunterschiede bei Ratten nach dem Modell von Havemann und Mitarbeitern durchgeführt. Die zwei charakteristischen Verhaltensweisen der "Nager" und "Schnüffler" wurden durch eine einmalige Apomorphingabe von 2 mg/kg pharmakologisch induziert und konnten dann im "Animex-Motility-Meter" (vgl. 1.5.1) aufgrund der gezeigten Stereotypen und dem lokomotorischen Verhalten unterschieden werden. Aus den Verhaltenstests und den molekularbiologischen Untersuchungen der Dopaminrezeptorgene D_1 und D_2 ergaben sich drei Aussagen, die im folgenden diskutiert werden: erstens ergaben sich genetische Variationen in den Dopaminrezeptorgen der "Nager" und "Schnüffler", zweitens konnten genetische Varianten der beiden Gene dargestellt werden und drittens zeigte sich eine Assoziation der drei Genotypen des D_2 -Rezeptorgens mit dem Laufverhalten der Ratten.

4.1.1 Genetische Variationen in den Dopaminrezeptorgen der "Nager" und "Schnüffler"

Die aufgrund des Dopaminagonisten Apomorphin unterschiedlich induzierten Verhaltensweisen der "Nager" und "Schnüffler" konnten durch die identifizierten Sequenzunterschiede nicht erklärt werden, da sie für das D_1 -Rezeptorgen bei allen sechs untersuchten Wistar Ratten vorkamen und für das D_2 -Rezeptorgen bei den Wistar Ratten unabhängig von den Verhaltenstypen auftraten (vgl. 3.1.2).

Die Verhaltensweisen der "Nager" und "Schnüffler" waren somit nicht auf die genomische Struktur der untersuchten Bereiche der zwei Rezeptorgene D_1 und D_2 zurückzuführen.

Die Hypothese, daß die unterschiedlichen Verhaltensweisen der Ratten auf die genomische Struktur der beiden Rezeptorgene D_1 und D_2 zurückzuführen sind, wurde zum einen durch Untersuchungen von Havemann und Mitarbeitern an ihrem Tiermodell gestützt, die die Einteilung der Tiere in "Nager" und "Schnüffler" aufgrund einer bestimmten Dosis von 2 mg/kg Apomorphin vornahmen und die Tiere mit dieser Dosis bei wiederholter Testung wieder in die gleiche Gruppe einordnen konnten (Havemann et al., 1986; Surmann & Havemann, 1995). Diese Beobachtungen legten nahe, daß unter den Tieren individuelle Unterschiede vorhanden sind, die eine genetische Ursache beispielsweise in Form unterschiedlicher Dopaminrezeptorgene D_1 und D_2 haben könnten, an die Apomorphin mit hoher Affinität bindet. Neben diesen beiden Rezeptorsubtypen besitzt Apomorphin auch eine geringe Affinität an D_3 -Rezeptoren (Sokoloff et al., 1990), so daß sich ein genetischer Unterschied, der für die zwei Verhaltensweisen ausschlaggebend sein könnte, an der genetischen Struktur dieser Rezeptoren äußern könnte. D_3 -Rezeptoren wurden in dieser Arbeit nicht untersucht. Zum anderen konnten Rots und Mitarbeiter (1996) naive Wistar Ratten aufgrund ihrer Apomorphinsensitivität züchten und erhielten zwei pharmakologisch selektierte Rattenlinien, die Unterschiede im dopaminergen System aufwiesen. Die eine Linie der als apomorphin-empfindliche bezeichneten Ratten, die den hier charakterisierten "Nagern" ähneln, zeigten eine erhöhte Menge an Tyrosinhydroxylase mRNA und vermehrte D_2 -Rezeptorbindungsstellen im nigrostriatalen Bereich. Diese Befunde gaben einen weiteren Hinweis darauf, daß Unterschiede bezüglich der Apomorphinsensitivität, wie sie bei den "Nagern" und "Schnüfflern" vorkamen, in ähnlicher Weise genetisch manifestiert sein könnten wie bei den selektierten Rattenlinien und durch eine Untersuchung der genomischen Struktur der Rezeptorgene identifiziert werden könnten. Zwischen verschiedenen Rattenstämmen waren schon früher Variationen in den Verhaltensantworten nach Apomorphingabe beobachtet worden (Helmste, 1983; Essman et al., 1995), was ebenfalls auf genetische Unterschiede im dopaminergen System hindeutete.

Als weitere Ursache für das individuell unterschiedliche Verhalten können die nach der Bindung von Apomorphin an die Rezeptoren ausgelösten Prozesse der Informationsweiterleitung eine genauso große Rolle spielen wie die Rezeptorgene bzw. die Rezeptorproteine selbst. So können die hier als "Schnüffler" bezeichneten Tiere zum Beispiel von der Aktivität der Adenylatzyklase her betrachtet zu den Tieren gezählt werden, die das empfindlichere AC-System besitzen (Birke und Havemann, pers. Mitteilung). Die Kopplung an die verschiedenen G-Proteine, G_s für den D_1 -Rezeptor und G_i für den D_2 -Rezeptor, ist ein weiterer Prozeß, an dem die Verhaltensunterschiede manifestiert sein können. Gerade diese Zuteilung der G-Proteine zu den beiden Rezeptorgen wird noch diskutiert. So beobachteten Waddington und Mitarbeiter (1995), daß die Zuordnung der G-Proteine nicht so strikt ist und daß es für die D_1 -artigen, wahrscheinlich auch für die D_2 -artigen

Rezeptoren mehrere verschiedene G_i- oder G_s-Proteine gibt, deren unterschiedliche Kopplung sich beispielsweise auf die motorischen Aktivität bei Ratten auswirken könnte. Thomas und Mitarbeiter (1992) beobachteten sogar eine Endkopplung der D₁-Rezeptoren von der Adenylatzyklase aufgrund einer Akutbehandlung mit Reserpin.

Die Einteilung der Tiere nach den zwei individuell unterschiedlichen Verhaltensweisen wurde auch nach der Ablehnung der Hypothese einer genetischen Ursache auf der Ebene der zwei untersuchten Rezeptoren beibehalten. Die "Nager" und "Schnüffler" zeigen auch unterschiedliche Reaktionen nach der Gabe von Dopaminantagonisten womit die Gültigkeit des Modells von Surmann und Havemann getestet wurde (1995). Daneben konnten Unterschiede in der Adenylatzyklase (AC) Aktivität in jüngster Zeit für den D₂-Rezeptor zwischen den zwei Verhaltenstypen gezeigt werden (Birke und Havemann, pers. Mitteilung), so daß die individuellen Verhaltensunterschiede dennoch im dopaminergen System begründet sein können, wenn auch nicht auf Ebene der untersuchten Gene.

Somit konnten genetische Varianten in den Dopaminrezeptorgenen D₁ und D₂ der "Nager" und "Schnüffler" identifiziert werden, die allerdings nicht für die zwei Verhaltensweisen verantwortlich waren.

4.1.2 Identifizierung genetischer Varianten der Dopaminrezeptorgene D₁ und D₂

Die Untersuchung der Dopaminrezeptorgene D₁ und D₂ zur Charakterisierung der "Nager" und "Schnüffler" erfolgte mit der Methode der direkten Sequenzierung von PCR-Produkten. Für die Sequenzierung der Rezeptorgene wurden nicht nur die kodierenden Regionen vollständig sequenziert, um Punktmutationen, die zu Stop-Codons führen können oder Insertionen und Deletionen feststellen zu können, sondern auch die Region der putativen Transkriptionsfaktorbindungsstellen im 5' Bereich der beiden Gene. Diese Bereiche waren für diese Untersuchung von großer Bedeutung, da Veränderungen in diesen Genregionen zu Unterschieden in der Expression der Gene führen können (Pao et al., 1995; Lesch et al., 1996; Arinami et al., 1997; Greenbaum et al., 1998). Der sequenzierte Bereich hatte somit für das D₁-Rezeptorgen eine Länge von 2962 bp und für das D₂-Rezeptorgen eine Länge von 2269 bp (vgl. 3.1.1.2, Tab.5). Eine alternative Methode zur direkten Sequenzierung wäre eine *single-strand conformation analysis* (SSCA) der Gene gewesen. Die SSCA Methode beruht darauf, daß einzelsträngige DNA-Moleküle, die sich in ihrer Sequenz unterscheiden, unterschiedliche Wanderungseigenschaften in einer Gelmatrix zeigen, die aufgrund einer durch eine Mutation hervorgerufene Konformationsänderungen entstehen (Orita et al., 1989). Diese Methode bietet den Vorteil, das gesamte Gen einschließlich des 3' Bereiches zu untersuchen. Der Nachteil der Methode ist die Ausbeute an Sequenzunter-

schieden, die nur zu einem Prozentsatz von ca. 90 % identifiziert werden (Hayashi, 1991), wobei nur Punktmutationen sicher entdeckt werden können, nicht aber Insertionen oder Deletionen. Die Sequenzierung dagegen identifiziert ca. 99 % aller vorhandenen Mutationen, benötigt aber einen größeren Zeitaufwand (Gross et al., 1999). Da es für die Untersuchung der Rezeptorgene entscheidend war, alle vorhandenen Mutationen einschließlich Insertionen und Deletionen zu identifizieren, wurde die Sequenzierung hier als Methode gewählt und führte zur Identifizierung von sechs Sequenzunterschieden für das D₁-Rezeptorgen sowie zwei Sequenzunterschieden für das D₂-Rezeptorgen im Vergleich zu den aus der Datenbank stammenden Vergleichssequenzen. Die Sequenzunterschiede lagen für beide Gene im 5'flankierenden und 5'untranslatierten Bereich der mRNA, der durch seine GC-reichen Regionen anderen Methoden wie der genannten SSCA Methode nur sehr schwer zugänglich ist.

Für den 5'flankierenden und den 5'untranslatierten Bereich der mRNA des D₁-Rezeptorgens ergab sich für die insgesamt acht untersuchten Tiere eine neue Sequenz im Vergleich zu der Vergleichssequenz D₁ aus der Datenbank. Im 5'flankierenden Bereich und im 5'UTR sind einfache Mutationen wie die drei identifizierten Basensubstitutionen häufig (Collins & Jukes, 1994), ebenso wie die Insertionen mit der Nummer 2219 und 2854 und die Deletion mit der Nummer 2211 häufige Mutationen im 5'UTR von Genen darstellen (Cooper et al., 1995) (vgl. 3.1.3). Trotz des generell häufigen Auftretens solcher Mutationen zeigte sich damit, daß die Methode der direkten Sequenzierung als effiziente Methode für die Identifizierung von Sequenzunterschieden gerade in den 5'flankierenden Bereichen der Gene geeignet war. Die zwei Sequenzunterschiede des D₂-Rezeptorgens wurden zwischen den sechs D₂-Rezeptorgensequenzen der Wistar Ratten, der Vergleichssequenz D₂ und der D₂-Rezeptorgensequenz der Sprague Dawley Ratten beobachtet (vgl. 3.1.4). Es handelte sich auch hier um einfache Mutationen, wobei die gefundenen Transitionen (vgl. 1.2.3) zu den Basensubstitutionen gehören, die absolut gesehen am häufigsten vorkommen (Cooper et al., 1995). Die beiden Transitionen im 5'flankierenden Bereich des D₂-Rezeptorgens wurden in vier der sechs untersuchten Rezeptorgensequenzen der Wistar Ratten identifiziert, wobei die Tiere immer heterozygot für die Mutationen waren.

Nach der Sequenzierung der D₂-Rezeptorgensequenzen von insgesamt 45 Wistar Tieren wurden die genetischen Varianten als T-355C Polymorphismus und A-257G Polymorphismus bezeichnet, da die Transitionen mit einer höheren Frequenz als 1% innerhalb der Rattenpopulation vorkamen. Nach Polymorphismen zwischen Rattenstämmen wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen (Luedtke et al., 1992; Scott et al., 1995) mit *Southern blot* Techniken gesucht, allerdings nur um genetische Marker für die Kartierung von Genen zur Verfügung zu haben. Dabei wurden beispielsweise zwei Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLP) beschrieben, die zwischen Wistar Ratten und Sprague Dawley Ratten unterscheiden (Luedtke et al., 1992). Bei diesen Polymorphismen handelte es sich allerdings um genetische Varianten, die in Introns liegen. Zudem ließ sich mit der *Southern*

blot Technik keine Aussage über die Ausprägung des Polymorphismus, die genaue Basensubstitution und die genaue Position im Gen machen. In dieser Arbeit konnten bezüglich der zwei Allele drei Genotypen definiert werden (vgl. 3.1.5), deren Häufigkeit zwischen den drei untersuchten Auszuchtstämmen Wistar, Sprague Dawley und dem Inzuchtstamm PVG unterschiedlich waren (vgl. 3.1.6). Die Auszuchtstämme waren daher durch das Vorkommen der Polymorphismen gekennzeichnet, während die untersuchten Tiere des Inzuchtstammes tatsächlich genetisch identisch waren. Zusätzlich zu der absoluten Häufigkeit konnte damit aufgrund der unterschiedlichen Frequenzen zwischen den verschiedenen Rattenstämmen von echten Polymorphismen in der Promotorregion des D₂-Rezeptorgens gesprochen werden und zwei weitere genetische Marker für die Genkartierung identifiziert werden.

Bei der Berücksichtigung der Lieferanten und damit der Züchtungen der Tiere zeigte sich, daß unter den Sprague Dawley Ratten der Firma Harlan Winkelmann nur Tiere mit dem Genotyp 1 (T-355T und A-257A) vorkamen, während bei den Ratten der Firma Charles River der Genotyp 2 (T-355C und A-257G) und der Genotyp 3 (C-355C und G-257G) auftrat (vgl. 3.1.6). Auf Nachfrage ergab sich, daß die Sprague Dawley Ratten bei den Firmen seit 1955 völlig getrennt gezüchtet wurden. Damit standen die Sprague Dawley Ratten von Charles River nach diesen Untersuchungen den Wistar Tieren genetisch näher als die Sprague Dawley Tiere von Harlan Winkelmann.

4.1.3 Assoziation der Genotypen des D₂-Rezeptorgens mit dem Laufverhalten von Ratten

Von den insgesamt 69 untersuchten Tieren waren 45 Wistar Ratten im "Animex-Motility-Meter" getestet worden und nach ihrem Genotyp bezüglich der Polymorphismen T-355C und A-257G charakterisiert worden. Dabei zeigte sich, daß die unterschiedlichen Genotypen einen Einfluß auf das Laufverhalten der Tiere hatten. Gemessen wurde das Laufverhalten mit dem Verhaltensparameter "gelaufene Strecke" (totale Distanz), der unabhängig von der Einteilung der Tiere in "Nager" und "Schnüffler" erhoben wurde (vgl. 2.2.1). Signifikant auf dem $p \leq 0,05$ Niveau war der Unterschied zwischen den Tieren mit dem Genotyp 1 und dem Genotyp 2. Die Tiere mit dem Genotyp 2 legten die geringste Distanz während des Tests zurück im Vergleich zu den Tieren mit den Genotypen 1 und 3. Der Unterschied zwischen den Tieren mit dem Genotyp 1 und dem Genotyp 3 ergab einen Hinweis auf einen Zusammenhang mit einem p-Wert von $p = 0,08$. Die Tiere mit dem Genotyp 1 wiesen mit durchschnittlich 3 m gelaufener Strecke die höchste horizontale lokomotorische Aktivität in Form der zurückgelegten Strecke auf. Im Vergleich zu den Tieren mit dem Genotyp 3 nahm diese allerdings nicht entsprechend der Allelverteilung ab,

was auf einen Gendosiseffekt und einen Einfluß der Polymorphismen auf die Expression des D₂-Rezeptorgens hingewiesen hätte.

Das Ergebnis, daß der heterozygote Typ die geringste lokomotorische Aktivität zeigte, deutete dagegen auf den Einfluß der Heterogenität dieser Positionen auf die Expression des Gens hin. Die Polymorphismen lagen nicht in putativen Transkriptionsfaktorbindungsstellen (O'Malley et al., 1990; Minowa et al., 1992), befanden sich aber nur 102 bp voneinander entfernt im Bereich von zwei Transkriptionsfaktorbindungsstellen. Daher bestand die Möglichkeit, daß es zur Änderung in der DNA-Bindung der Transkriptionsfaktoren und anderen *enhancern*¹⁰ kommen konnte, so daß die Transkription des Gens reduziert oder erhöht werden konnte. Da nicht allein die Rezeptoranzahl für die Wirkung von Apomorphin ausschlaggebend ist, sondern auch der Einfluß der beiden Rezeptorsubtypen D₁ und D₂ aufeinander (Waddington et al., 1995; Kelly et al., 1998) und die nachgeschalteten Signalkaskaden wichtig sind, lassen sich die Effekte der Homozygotie nicht eindeutig erklären.

Kelly und Mitarbeiter (1998) konnten bei den heterozygoten D₂-Rezeptor knock-out Mäusen zeigen, daß diese ca. 50% der Rezeptordichte der Wildtyp Mäuse hatten und dazu eine geringere lokomotorische Aktivität aufwiesen als die Wildtyp Mäuse, aber eine höhere Aktivität als die homozygoten knock-out Mäuse. Somit könnte die höhere lokomotorische Aktivität der homozygoten Tiere im Vergleich mit der Aktivität der heterozygoten Tiere bedeuten, daß die heterozygote Form die sterisch ungünstigste Form für die DNA-Bindung der Faktoren ist. Aus dieser möglichen Reduktion der Expression des Gens resultierte dann eine geringere Rezeptoranzahl oder Sensitivität der Rezeptoren, was zur Abnahme der lokomotorischen Aktivität führen könnte. Diese Hypothese läßt sich allerdings nur unter zwei Annahmen bilden, erstens daß es bei den heterozygoten Tieren durch die Polymorphismen in der Promotorregion zu einer Verminderung der Expression kommt, wobei Mutationen im Promotor meist zur Expressionsreduktion führen (Pao et al., 1995; Surinya et al., 1997; Greenbaum et al., 1998) und zweitens daß eine Reduktion der Rezeptoranzahl nach Apomorphingabe zu einer geringeren lokomotorischen Aktivität führt.

Hierbei handelt es sich allerdings um nur eine mögliche Erklärung. Zudem ist für eine statistisch gesicherte Aussage die Anzahl der untersuchten Tiere in den drei Gruppen mit 8-23 untersuchten Tieren noch zu gering. Dennoch ist dieser Befund der erste, in dem pharmakologisch induziertes Verhalten mit spezifischen Polymorphismen bzw. Genotypen assoziiert wurde.

¹⁰ Kombination kurzer Sequenzelemente, die in unmittelbarer Nähe oder weit entfernt vom Transkriptionsstart vorkommen können und die Transkription verstärken.

4.2 Untersuchungen zum dopaminergen System bei alkoholabhängigen Patienten

Die Untersuchungen des dopaminergen Systems in diesem Teil der Arbeit hatten zum Ziel, alle Assoziationen des dopaminergen Systems mit der Erkrankung der Alkoholabhängigkeit zu finden und die Ätiologie der Krankheit anhand von Persönlichkeitsmerkmalen und dem Apomorphintest differenzierter zu beschreiben. Dazu wurde eine Assoziationsuntersuchung mit sechs Polymorphismen des dopaminergen Systems in einer Stichprobe von 244 bzw. 161 alkoholabhängigen Patienten durchgeführt. Diese Studie führte für alle sechs Polymorphismen zu einem negativen Ergebnis. Für eine Assoziation des Exon III Polymorphismus mit den Persönlichkeitsmerkmalen *novelty seeking*, *harm avoidance* und *reward dependence*, erhoben mit dem Temperament- und Charakter-Inventar (TCI), zeigten sich einige Hinweise, die allerdings nicht signifikant waren. Der Apomorphintest erlaubte eine zusätzliche Charakterisierung von 32 Probanden über ihre Hormonreaktionen und erwies sich als Möglichkeit, das Probandenkollektiv genauer zu charakterisieren.

4.2.1 Effekte des Apomorphintests im dopaminergen System

Der Apomorphintest wurde analog zu dem Verhaltenstest der Ratten zur Charakterisierung von individuellen Unterschieden im dopaminergen System von Patienten verwendet. Allgemein entsprachen die ermittelten Hormonprofile der Probanden erwarteten Werten, wobei Unterschiede in der Hormonreaktion zwischen Patienten und Kontrollen zu beobachten waren. Diese Unterschiede zwischen beiden Gruppen waren für Prolaktin und GH nicht signifikant. Für die Cortisolspiegel zeigten sich in der Gruppe der Patienten an drei Zeitpunkten nach der Apomorphingabe im Mittelwert signifikant niedrigere Cortisolspiegel als in der Kontrollgruppe. Dieser Trend deutete sich für die Prolaktinspiegel ebenfalls an, war aber statistisch zu keinem Zeitpunkt signifikant. Diese Unterschiede könnten ihre Ursache in einer verminderten Rezeptorsensitivität zentraler dopaminergener Neurone bei Alkoholabhängigen haben, wie sie von Finckh und Mitarbeitern (1997) zum Zeitpunkt der frühen Abstinenz gezeigt worden war. Darauf wies auch die subjektive Unempfindlichkeit der Alkoholiker gegenüber den Nebenwirkungen von Apomorphin während des Tests hin (Anghelescu, pers. Mitteilung).

Die Genotypisierung der 15 Patienten und 16 Kontrollen bezüglich der drei D₂-Rezeptor-genpolymorphismen A-241G, -141C Ins/Del und TaqI A ergab einen Hinweis auf eine unterschiedliche Allelverteilung zwischen den Gruppen für den -141C Ins/Del Polymorphismus und für den TaqI A Polymorphismus. Bei den alkoholabhängigen Patienten kam

das TaqI A1-Allel deutlich häufiger vor als bei den Kontrollen (25 % vs. 9,38 %). In dieser kleinen Stichprobe fand sich demnach eine Tendenz, die den Erstbefund von Blum und Mitarbeitern (1990) bezüglich der Assoziation des TaqI Polymorphismus und der Alkoholabhängigkeit bestätigte. Für den -141C Ins/Del Polymorphismus ergab sich ein Ungleichgewicht für das -141C Del Allel, das bei den Patienten überhaupt nicht auftrat im Vergleich zu 9,37% bei den Kontrollen. Es handelt sich bei dem -141C Ins/Del Polymorphismus um einen funktionellen Polymorphismus, bei dem die Deletionsvariante mit einer geringeren Expression des Gens einhergeht und für den Arinami und Mitarbeiter (1997) eine Assoziation mit der Schizophrenie in ihrem Kollektiv beschrieben hatten. Der A-241G Polymorphismus zeigte eine gleichmäßige Verteilung in den untersuchten Gruppen, so wie sie auch Arinami und Mitarbeiter (1997) in einem Kollektiv von schizophrenen Patienten gefunden hatten, ebenso wie auch Sander und Mitarbeiter (1999) eine Gleichverteilung der Allele in einem Kollektiv von Alkoholabhängigen beobachtet hatten.

Die Hormonspiegel jedes einzelnen der 31 Probanden zeigten nach Apomorphingabe erwartete Verläufe. Bei den vier Probanden mit den Genotypen A1/A1 für den TaqI Polymorphismus und -141 C Ins/Del für den -141C Ins/ Del Polymorphismus konnten keine auffälligen Hormonreaktionen nach Apomorphingabe im Vergleich zu den 27 weiteren Probanden festgestellt werden. Ein Einfluß des Genotyps hätte sich nach der aufgestellten Hypothese ergeben sollen. Da es sich bei dem -141C Ins/Del Polymorphismus wie erwähnt um einen funktionellen Polymorphismus handelte, wäre ein veränderter Verlauf der Hormonspiegel im Vergleich zu den restlichen Probanden zu erwarten gewesen, wenn der Polymorphismus in vivo für eine Reduktion des Rezeptorproteins über die Verminderung der Expression des Gens verantwortlich wäre. Mit dem TaqI A Polymorphismus war ebenfalls kein auffälliger Hormonspiegel assoziiert. Dieser Befund bestätigt die Ergebnisse von Heinz und Mitarbeitern (1996), die ebenfalls keine Assoziation des TaqI A Polymorphismus des D₂-Rezeptorgens mit der Wachstumshormonreaktion bei alkoholabhängigen Patienten gefunden haben.

Sowohl für die Assoziationsuntersuchungen mit den drei Polymorphismen als auch für die Korrelationsuntersuchungen der Hormonspiegel mit den Genotypen war die untersuchte Stichprobe sehr klein. Die Ergebnisse sind daher als erster Hinweis zu werten, die in einer größeren Stichprobe repliziert werden müssen.

4.2.2 Assoziationsuntersuchungen zwischen Polymorphismen des dopaminergen Systems und der Erkrankung der Alkoholabhängigkeit

4.2.2.1 Assoziationsstudie mit sechs Polymorphismen des dopaminergen Systems

In der Literatur wurden bisher meist einzelne Polymorphismen des dopaminergen Systems mit Erkrankungen assoziiert (La Hoste et al., 1994; Li et al., 1997; Sander et al., 1997b, Schmidt et al., 1998). In dieser Arbeit wurde eine Assoziationsstudie mit sechs Polymorphismen des dopaminergen Systems in einem Probandenkollektiv durchgeführt. Die Assoziationsstudie erbrachte keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der Erkrankung der Alkoholabhängigkeit und einem der sechs untersuchten Polymorphismen in dem Probandenkollektiv. Es ergab sich auch kein Hinweis auf eine mögliche Assoziation (vgl. 3.3). Damit stehen diese Ergebnisse einerseits im Einklang mit, andererseits im Widerspruch zu Befunden aus der Literatur. Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurde mit einzelnen Polymorphismen ebenfalls keine Assoziation der Polymorphismen des dopaminergen Systems und Alkoholismus beobachtet (Turner et al., 1992; Malhotra et al., 1996; Sander et al., 1997a; Parsian et al., 1997; Edenberg et al., 1998). Dagegen wurden von anderen Arbeitsgruppen positive Befunde zur Assoziation von Alkoholismus und Polymorphismen der Gene des dopaminergen Systems berichtet (Blum et al., 1990; Sander et al., 1997b, Schmidt et al., 1998; Noble et al., 1998). Diese widersprüchlichen Ergebnisse waren vor allem auf die Auswahl der Kontrollprobanden zurückzuführen, die für Assoziationsstudien von großer Bedeutung ist (vgl. 1.5.4) (Lander & Schork, 1994; Burmeister, 1999). Zudem konnten die positiven Assoziationen meist zwischen klinischen Subtypen der Alkoholiker beobachtet werden (Sander et al., 1997b, Schmidt et al., 1998), so daß deutlich wird, wie wichtig die genaue Charakterisierung der alkoholabhängigen Patienten bei der Anwendung von Assoziationsuntersuchungen ist (Owen et al., 1997; Burmeister, 1999). Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden erstmals sechs Polymorphismen des dopaminergen Systems auf Assoziation mit der Alkoholabhängigkeit untersucht, wobei jedoch die jeweiligen Ergebnisse negativ ausfielen.

Assoziationsuntersuchungen sind statistische Verfahren, die von populationsbiologischen, statistischen und diagnostischen Problemen beeinflusst werden können. In dem untersuchten Probandenkollektiv konnte eine ethnische Besonderheit unseres Probandenkollektivs ausgeschlossen werden, da die Allel- und Genotypenfrequenzen denen vergleichbarer Populationen entsprachen (Sander et al., 1997a; 1997b; Chang et al., 1996). Im Vergleich zu früheren Studien war die Anzahl der untersuchten Patienten groß (Blum et al., 1990; Turner et al., 1992; Malhotra et al., 1996), so daß das Fehlen einer Assoziation nicht auf eine zu geringe Probandenanzahl zurückzuführen war, wenn die untersuchten Gene zu wichtigen Kandidatengenen für die Alkoholabhängigkeit gehören. Es sei denn, daß es sich bei den untersuchten dopaminergen Genen um solche handelt, die mit einem nur geringen

Anteil neben anderen Genen an der Ätiologie des Alkoholismus beteiligt sind, so daß statistisch gesehen die Anzahl der untersuchten Probanden dennoch zu gering gewesen wäre, um eine Assoziation aufzudecken. Als weiterer Punkt spielt bei der Verwendung der Methode der allelen Assoziation die Exaktheit der Diagnose der Patienten eine große Rolle. Die Diagnose der Alkoholabhängigkeit im Rahmen dieser Arbeit erfolgte nach internationalen Richtlinien des DSM-IV (vgl. 2.3.1) und wurde zusätzlich mit anerkannten psychologischen Fragebögen gestützt mit deren Hilfe auch eine Unterteilung in Untergruppen vorgenommen werden kann (z. B. ängstlich-vermeidender oder antisozialer Subtyp). Eine solche Charakterisierung von Untergruppen ist augenblicklich noch Gegenstand der Forschung und wird kontrovers diskutiert, so daß allgemeingültige Regeln noch nicht existieren. Eine absolut exakte Typisierung der Patienten ist aber für genetische Untersuchungen von essentieller Bedeutung, da dann die Wahrscheinlichkeit steigt, Anfälligkeitsloci für die Erkrankung zu identifizieren.

Ein weiteres Problem der Assoziationsstudien ist wie oben erwähnt die Auswahl sinnvoller Kandidatengene für die Erkrankung. Es bestand nach der neusten Literatur (Carlsson et al., 1997; Mohn et al., 1999; Garris et al., 1999) durchaus die Möglichkeit, daß es sich bei den hier untersuchten dopaminergen Genen nicht um Kandidatengene für Alkoholismus handelte. Die Erklärung der Gene des dopaminergen Systems als Kandidatengene für Alkoholismus beruht vor allem auf tierexperimentellen Beobachtungen (Di Chiara & Imperato, 1988; Weiss et al., 1993; Crabbe et al., 1994) und auch auf Ergebnissen aus Untersuchungen mittels *Single Photon Emission Computed Tomography* (SPECT) (Volkow et al., 1990; Tiihonen et al., 1995), die alle eine Beteiligung des dopaminergen Systems an den Effekten von Alkohol nachweisen konnten. Von Garris und Mitarbeitern (1999) wird der Neurotransmitter Dopamin im Zusammenhang mit seiner Rolle im Belohnungssystem (vgl. 1.4.1) heute mehr als neurales Substrat für „Belohnungserwartung“ als für die Belohnung selbst angesehen, so daß das dopaminerge System somit mehr als Ort des Auftretens der neurochemischen Korrelate von Abhängigkeit diskutiert wird, weniger als der Entstehungsort der Erkrankung. So kann es daher möglich sein, daß es sich bei den Genen des dopaminergen Systems nicht um die entscheidenden Kandidatengene für die Alkoholabhängigkeit handelt. Von Carlsson und Mitarbeitern (1997) wurde beispielsweise postuliert, daß dopaminerge Neurone vielfältig auch durch andere Transmittersysteme moduliert werden. Dies bedeutet, daß das dopaminerge System wahrscheinlich stärker als früher angenommen unter dem Einfluß glutamaterger und serotonerger Mechanismen steht.

Trotz aller genannten Probleme konnten für die einzelnen untersuchten Polymorphismen einige charakteristische Beobachtungen gemacht werden.

So wurde in dieser Arbeit für den Exon III Polymorphismus des D₄-Rezeptorgens eine deutlich höhere Frequenz des 7er Allels bei den Patienten (20,7 %) gegenüber den Kontrollen (14,95 %) ermittelt, was in fast allen Untersuchungen des Exon III Polymorphismus ebenso

beobachtet wurde (Ebstein et al., 1996; Malhotra et al., 1996; Sander et al., 1997a). Nach der Einteilung der Patienten und Kontrollprobanden nach langen (> 5 *repeats*) und kurzen Allelen (vgl. 3.3.2) ergab sich ein Trend für eine höhere Frequenz der langen Allele in der Gruppe der Alkoholiker (39,75 %) im Vergleich zu den Probanden (29,9 %). Die erhöhte Frequenz der langen Allele in der Gruppe der Patienten wurde beispielsweise für die ADHD und die Heroinabhängigkeit beobachtet und dort auch mit der Erkrankung assoziiert (Li et al., 1997; LaHoste et al. 1996; Pérez de Castro et al., 1997).

Der TaqI A Polymorphismus des D₂-Rezeptorgens zeigte keine Assoziation mit der Alkoholabhängigkeit, wie von einigen Arbeitsgruppen beschrieben (Gelernter et al., 1991, 1992; Gelernter & Kranzler, 1999). Für das hier untersuchte Kollektiv wurde damit der vieldiskutierte Befund von Blum und Mitarbeitern (1990) widerlegt. Die von Blum und Mitarbeitern beschriebene Assoziation des TaqI A Polymorphismus mit Alkoholismus läßt sich dabei mehr als bei späteren Studien vor allem auf die ungenaue Auswahl der Kontrollprobanden und die geringe Probandenzahl (30) zurückführen, was in der hier durchgeführten Studie verbessert wurde.

Für den MscI Polymorphismus des D₃-Rezeptorgens wurde bisher erst in einer Studie ein negatives Ergebnis für eine Assoziation mit der Alkoholabhängigkeit nachgewiesen (Gorwood et al., 1995), wobei die Größe der Stichproben mit 72 Patienten gering war. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigten den negativen Befund jetzt mit einer größeren Anzahl an Probanden. Der MscI Polymorphismus scheint nicht mit der Alkoholabhängigkeit assoziiert. Neuerdings wird er mit Drogenmißbrauch und in einigen Studien mit der Schizophrenie assoziiert (Krebs et al., 1998; Dubertret et al., 1998; Duaux et al., 1998).

Die Assoziationsuntersuchung mit dem Bsp1286I Polymorphismus und Alkoholismus wurde mit dem Polymorphismus in einer so großen Stichprobe zum ersten Mal durchgeführt und zeigte ein negatives Ergebnis. Von Heinz und Mitarbeitern (1996) wurde bei einer geringen Probandenzahl von 97 Alkoholabhängigen ebenfalls keine Assoziation gefunden. Eine positive Assoziation war bisher nur mit dem DdeI Polymorphismus des D₁-Rezeptorgens im Zusammenhang mit allgemeinem Abhängigkeitsverhalten beschrieben worden (Comings et al., 1997).

Bei der Assoziationsstudie mit dem Val81Met Polymorphismus der Tyrosinhydroxylase handelt es sich um die erste Studie mit diesem Polymorphismus. Allerdings konnte hier keine Assoziation mit der Alkoholabhängigkeit identifiziert werden. Mit dem *tetranucleotide repeat* Polymorphismus des TH-Gens war in einer Stichprobe von chronisch Alkoholabhängigen eine Assoziation nachgewiesen worden ($p = 0,041$; Geijer et al., 1997), wobei es sich hier um eine Subgruppe mit spätem Trinkbeginn handelte. Der schwache Hinweis auf eine Assoziation des Tyrosinhydroxylasegens mit der Alkoholabhängigkeit in der untersuchten Stichprobe war nicht signifikant und ergab sich artifiziell durch die Verschiebung des Hardy-Weinberg-Equilibriums (vgl. 2.14.1 und 3.3.1) in der Kontrollprobandengruppe. Daher wird er nicht weiter interpretiert.

Die Allelverteilung des Dopamintransporter-Polymorphismus zeigte nicht die von Sander und Mitarbeitern (1997b) beschriebene Häufung des A₉ Allel des 40bp VNTRs bei den Patienten in diesem Kollektiv. Auch zeigte sich keine höhere Frequenz an Homozygoten für das A₉ Allel in der Gruppe der Typ II Alkoholiker, wie sie ebenfalls von Sander und Mitarbeitern (1997b) beobachtet wurde. Auffällig, aber nicht signifikant war in der untersuchten Kontrollprobandengruppe die Gleichverteilung der Genotypen A₁₀/A₁₀ und A₉/A₉ (46,4% und 45,4%), die in vergleichbaren Populationen nicht beobachtet werden konnte. Allerdings bestand kein signifikanter Unterschied der Kontrollprobanden zum Hardy-Weinberg-Equilibrium, so daß diese Beobachtung als Auffälligkeit bestehen blieb.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß in dem untersuchten Kollektiv an Patienten und Probanden eine Assoziation der Alkoholabhängigkeit mit den untersuchten Polymorphismen des dopaminergen Systems nicht identifiziert werden konnte, sich jedoch im Einklang mit der Literatur einige Auffälligkeiten in bezug auf die Allel- und Genotypenverteilung zwischen den Gruppen zeigten.

4.2.2.2 Assoziationsstudie nach Einteilung der Patienten in Typ I und Typ II nach Cloninger

Die Einteilung der Patienten in die zwei Typen nach Cloninger trennt die Alkoholiker nach dem Schweregrad der Erkrankung und ermöglicht damit eine genauere Charakterisierung der Patienten. Die Typeneinteilung mit den Vorgaben von Gilligan und Mitarbeitern (1988), die hier analog zu der Einteilung nach Cloninger verwendet wurde, ergab eine fast vollständige Gleichverteilung der beiden Typen innerhalb der untersuchten Stichprobe. Nach Cloninger (1987) ist der Typ II bei Alkoholabhängigen seltener als der Typ I, was in dieser Stichprobe nicht beobachtet wurde und in der anderen Art der Einteilung begründet sein könnte (Szegedi, pers. Mitteilung). Für die Assoziationsuntersuchung bedeutete diese Gleichverteilung, daß sich kein Unterschied in der Genotypenverteilung zwischen den Gruppen ergab. Auch die Betrachtung der zwei Typenstichproben im Vergleich zu den Kontrollen zeigte keinen signifikanten Unterschied. Beispielsweise wäre zu erwarten gewesen, daß die Alkoholiker vom Typ II vermehrt das lange Allel des Exon III Polymorphismus des D₄-Rezeptorgens aufweisen oder vermehrt homozygot für das A₉-Allel des VNTR des DAT1-Gens wären, wie es Sander und Mitarbeiter (1997b) in ihrer Population beobachten konnten.

4.2.2.3 Assoziationsstudie nach der Bildung von "kombinierten Genotypen"

In der Assoziationsstudie mit einer Kombination der Allelvarianten des TaqI Polymorphismus des D₂-Rezeptors und des 40 bp VNTR des Dopamintransportergens konnte in der Patienten- und Kontrollgruppe keine Assoziation eines "kombinierten Genotyps" mit der Alkoholabhängigkeit nachgewiesen werden. Es wurden die beiden Polymorphismen ausgewählt, da der TaqI Polymorphismus des D₂-Rezeptorgens in einigen Studien mit der Alkoholabhängigkeit assoziiert wurde (Blum et al. 1990; Comings et al., 1991), genauso wie der 40 bp VNTR des Dopamintransportergens (Sander et al., 1997; Muramatsu & Higuchi, 1995). In der untersuchten Stichprobe hätte sich eine Häufung des Genotyps 2 (1 x A₁ und 1 x A₉) zeigen müssen, da dieser Typ die höchste Dosis an Allelen vereinte, die nach früheren Befunden mit der Erkrankung assoziiert sein sollten. Der Unterschied zwischen der Gruppe der Patienten und der Kontrollen war mit $p = 0.473$ nicht signifikant und auch nicht als Trend zu betrachten. Somit besteht jetzt noch die Möglichkeit, daß nur eines der untersuchten Gene als Kandidatengen für Alkoholismus in Frage kommt, da bereits positive Befunde mit den einzelnen Allelen beschrieben wurden. Die Kombination zwischen Allelen verschiedener Systeme, wie sie von Noble und Mitarbeiter (1998) vorgenommen wurde, hatte eine Assoziation bei der gemeinsamen Betrachtung eines Polymorphismus des GABAergen Systems und des TaqI A Polymorphismus des D₂-Rezeptorgens mit der Alkoholerkrankung ergeben.

Zusammenfassend läßt sich für die hier durchgeführten Assoziationsuntersuchungen sagen, daß nach den Assoziationsstudien mit den sechs Polymorphismen des dopaminergen Systems, nach der Einteilung in die Typen nach Cloninger und mit den "kombinierten Genotypen" kein Hinweis auf eine allele Assoziation mit der Alkoholabhängigkeit in den untersuchten Probanden bestand.

4.2.3 Assoziation von Polymorphismen des dopaminergen Systems mit Persönlichkeitsmerkmalen

Eine Assoziation zwischen dem Persönlichkeitsfaktor *novelty seeking* und dem Exon III Polymorphismus des D₄-Rezeptorgens, wie sie von Ebstein und Mitarbeitern (1996, 1997) und einer Gruppe um Benjamin (1996) bei gesunden Probanden beschrieben wurde, konnte bei den hier untersuchten Patienten und Kontrollprobanden nicht nachgewiesen werden. Es ergab sich keine signifikante Assoziation des 7er Allels bzw. der langen Allele mit der Persönlichkeitsdimension *novelty seeking* bei den Alkoholabhängigen. Allerdings zeigte sich ein Trend für eine Assoziation der Persönlichkeitsdimension *novelty seeking* bei den gesunden Probanden mit dem Exon III Polymorphismus, was dem Befund von Ebstein

und Benjamin entspricht. Dieser Trend wurde nur bei der Betrachtung der Gruppen 4/4 und 4/7 beobachtet. Bei den Gruppierungen 7er Allel versus nicht 7er und lange Allele versus kurze Allele wurde dieser Trend für eine Assoziation nicht deutlich. Der Befund von Ebstein umfaßt aber eine Assoziation für alle drei Gruppierungen. Das Auftreten des Trends nur in dieser Gruppierung läßt sich schwer erklären, da es sich um ein statistisches Verfahren mit unverändertem Kontrollprobandenkollektiv für die gesamte Untersuchung handelte, so daß populationsbiologische Unterschiede nicht gegeben sind. Die Hinweise auf eine Assoziation der Persönlichkeitsdimension *novelty seeking* bei gesunden Probanden wurden jetzt durch den Befund von Strobel und Mitarbeitern (1999) wieder bestätigt, was nahelegt, daß diese Persönlichkeitsdimension tatsächlich mit dem dopaminergen System assoziiert ist.

Für die Kombination aus den Temperamentsfaktoren *novelty seeking* und *reward dependence* deutete sich bei den Kontrollprobanden eine Signifikanz bezüglich einer Assoziation mit dem Exon III Polymorphismus in allen drei Allelgruppierungen an. Es handelt sich allerdings bei den Assoziationsstudien um ein statistisches Verfahren, so daß auf multiples Testen korrigiert werden mußte. Die Bonferroni-Korrektur ergab ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,006$. Dieses Signifikanzniveau erreichten die beobachteten Assoziationen nicht. Sie wurden, da der p-Wert bei 0,009 lag, als Trend betrachtet und als Hinweis für eine Assoziation des Exon III Polymorphismus und einer Kombination von Persönlichkeitsdimensionen gewertet. Sander und Mitarbeiter (1997a) erwähnten in ihrer Diskussion ebenfalls ein vermehrtes Auftreten von langen Allele und von *reward dependence* bei schwer alkoholabhängigen Patienten in Form eines statistischen Trends. Ein weiterer Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen dem Exon III Polymorphismus mit der Dimension *reward dependence* berichteten Ebstein und Mitarbeiter (1997) auch bei gesunden Probanden. Sie wiesen eine Assoziation der Persönlichkeitsdimension *reward dependence* mit einem Polymorphismus des Gens für den Serotoninrezeptor 2c nach, wobei der Effekt bei Personen verstärkt war, die das lange Allel des Exon III Polymorphismus hatten. Die Überlegung, daß eine Allelverteilung in dem untersuchten Probandenkollektiv wahrscheinlicher mit einer Kombination an Temperamentsfaktoren abweicht, als mit einem einzelnen Faktor, war der Grund für die differenzierte statistische Einteilung der Probanden bezüglich der Temperamentsfaktoren. Die Möglichkeit, ein Individuum durch den Ausprägungsgrad verschiedener kombinierbarer Dimensionen zu beschreiben, stellte einen entscheidenden Vorteil des verwendeten dimensional Persönlichkeitsmodells von Cloninger dar.

Der Exon III Polymorphismus des D₄-Rezeptorgens wurde als einziger von den sechs untersuchten Polymorphismen für diese Art der Assoziationsstudie herangezogen, da es sich um einen funktionellen Polymorphismus handelt, mit dem bisher die meisten Assoziationen mit Persönlichkeitsdimensionen beschrieben wurden (Ebstein et al., 1996; Benjamin et al., 1996; Ebstein et al., 1997; Strobel et al., 1999). Außerdem wiesen erste Befunde in einer kleinen Stichprobe auf eine positive Assoziation der langen Allele mit einer Kombination von Persönlichkeitsmerkmalen hin (Szegedi, pers. Mitteilung). Auch hier konnten

populationsbiologische Unterschiede nicht für das Verschwinden dieses Befundes verantwortlich gemacht werden, da die Allelfrequenzen der hier untersuchten Stichproben den Daten aus vergleichbaren Populationen entsprachen (Chang et al. 1996, Sander et al. 1997). Daß sich trotz eines Kollektivs von 244 Patienten keine Assoziation zwischen Persönlichkeitsfaktoren und dem Polymorphismus feststellen ließ, spricht letztlich gegen einen Zusammenhang zwischen Persönlichkeitsmerkmalen und D₄-Rezeptorgen bei den hier untersuchten alkoholabhängigen Patienten.

4.3 Perspektiven

Die vorliegende Arbeit stellt Ergebnisse aus Untersuchungen von genetischen Varianten im Zusammenhang mit individuellen Unterschieden des dopaminergen Systems im Tiermodell und Veränderungen im dopaminergen System bei alkoholabhängigen Patienten dar. Die Ergebnisse zeigen im Zusammenhang mit dem apomorphininduzierten Verhalten bei Ratten einen Einfluß der Genotypen auf das Laufverhalten der Tiere. Daraus ergibt sich, daß Polymorphismen tatsächlich mit dem durch Substanzen hervorgerufenen Verhalten assoziiert sein können, wenn es sich dabei um Polymorphismen in den Genen der pharmakologischen Zielstrukturen handelt. Weitere Untersuchungen darüber, wie sich solche Polymorphismen in der Promotorregion beispielsweise auf die Expression der Gene auswirken oder wie sie die genetische Struktur und die Anzahl der Rezeptorproteine verändern, sollten daran angeschlossen werden.

Die überwiegend negativen Beobachtungen für die Assoziationsstudien beim Menschen weisen auf die Probleme bei der Verwendung dieses Verfahrens hin. Die Idee, über Polymorphismen Kandidatengene für solche komplexen Erkrankungen wie Alkoholismus zu identifizieren, muß mit Vorsicht betrachtet werden. Wichtig für diese Untersuchungen ist vor allem die wissenschaftlich fundierte Auswahl der zu untersuchenden Gene und Polymorphismen, wobei diese eine Auswirkung auf die Gen- oder Proteinstruktur haben sollten („funktionelle Polymorphismen“).

Desweiteren ist es interessant, die Wirkung von pharmakologischen Substanzen unter Berücksichtigung der genetischen Struktur der beteiligten metabolisierenden Enzyme sowie der Rezeptorproteine zu analysieren. Dies erscheint als ein wichtiger Ansatz neben der Suche nach den genetischen Ursachen komplexer Erkrankungen und der Suche nach Assoziation genetischer Varianten mit spezifischen Persönlichkeitsmerkmalen. Der Apomorphintest bei Probanden stellt beispielsweise einen indirekten Weg in die pharmakologische Untersuchungsrichtung von Rezeptorsystemen und ihren genetischen Varianten dar, die mit anderen pharmakologischen Substanzen weiterverfolgt werden sollte.

5 Zusammenfassung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit genetischen Varianten des dopaminergen Systems und ihren funktionellen Konsequenzen im Tiermodell und beim Menschen.

Im Tiermodell wurde apomorphininduziertes Verhalten bei Ratten getestet und die Dopaminrezeptoren D_1 und D_2 auf molekulare Veränderungen untersucht. Beim Menschen wurden über einen Apomorphintest die Sensitivität von Dopaminrezeptoren und der Einfluß genetischer Varianten auf die neuroendokrinen Reaktionen geprüft und mit Hilfe von Assoziationsuntersuchungen der Zusammenhang zwischen DNA-Sequenz-Polymorphismen des dopaminergen Systems und der Erkrankung der Alkoholabhängigkeit getestet.

In dem Verhaltensmodell wurden Ratten in einem "Animex-Motility-Meter" nach einer einmaligen Apomorphindosis von 2 mg/kg in zwei Verhaltensgruppen eingeteilt. Die eine Gruppe von Tieren definierte sich durch stereotypes Nagen und gesteigerte lokomotorische Aktivität ("Nager"). Die andere Gruppe von Tieren wies stereotypes Schnüffeln auf und zeigte extrem gesteigerte lokomotorische Aktivität ("Schnüffler"). Die Sequenzanalyse der Dopaminrezeptorgene D_1 und D_2 ergab keine Unterschiede in der DNA-Sequenz zwischen den zwei Verhaltensgruppen. Für das D_1 -Rezeptorgen wurde eine neue Sequenz des Promotor- und des 5' untranslatierten Bereichs ermittelt, die sich in sechs Basen von der D_1 -Sequenz der Datenbank unterschied. Für das D_2 -Rezeptorgen wurden zwei Polymorphismen identifiziert. Die Polymorphismen liegen im Promotor des D_2 -Rezeptorgens und wurden als T-355C-Polymorphismus und A-257G-Polymorphismus bezeichnet. Die sich daraus ergebenden Genotypen waren mit dem Parameter "gelaufene Strecke" (totale Distanz) im Verhaltenstest assoziiert.

Der Apomorphintest bei 16 alkoholabhängigen Patienten und 16 Kontrollen ergab eine signifikant geringere Cortisolreaktion nach Apomorphingabe bei den Patienten verglichen mit den Reaktionen der Kontrollen. Die D_2 -Rezeptorgenotypen von drei Polymorphismen waren in beiden Gruppen nicht mit der Reaktionen der Hormone Prolaktin, Cortisol und Somatotropin assoziiert.

Die Assoziationsstudien mit Polymorphismen des dopaminergen Systems und der Alkoholabhängigkeit wurden bei 161 bzw. 244 alkoholabhängigen Patienten und 97 Kontrollprobanden durchgeführt. In den Assoziationsuntersuchungen wurde keine Assoziation zwischen den untersuchten DNA-Sequenz-Polymorphismen der Dopaminrezeptorgene D_1 , D_2 , D_3 , D_4 , des Dopamintransportergens und des Tyrosinhydroxylasegens und der Alkoholabhängigkeit gefunden. Ebenso konnte bei der Einteilung der Stichproben nach besonders empfindlichen Genotypen keine Assoziation nachgewiesen werden. Eine Assoziation zwischen der Persönlichkeitsdimension *novelty seeking* aus dem TCI mit dem Polymorphismus des D_4 -Rezeptorgens konnte in unserer Stichprobe für die alkoholabhängigen Patienten nicht gezeigt werden. Es ergab sich allerdings ein Hinweis auf eine Assoziation der Dimension *novelty seeking* mit dem D_4 -Rezeptorpolymorphismus bei den gesunden

Kontrollen. Auch die Kombination der Persönlichkeitsdimensionen *novelty seeking* und *reward dependence* ergab einen Trend für eine Assoziation mit dem Polymorphismus bei den Kontrollen.

Insgesamt zeigen die Befunde, daß die im Rahmen der Arbeit neu entdeckten genetischen Varianten im dopaminergen System einen Einfluß auf das motorische Verhalten im Tiermodell einen Einfluß hatten. Da es sich bei diesen Varianten um Mutationen in der Promotorregion des D₂-Rezeptorgens handelte, ist anzunehmen, daß die Basensubstitutionen Konsequenzen für die Expression des D₂-Rezeptorgens hatten, während die anderen in dieser Arbeit untersuchten Varianten solche Konsequenzen nicht hatten oder durch kompensatorische Effekte in der Entwicklung im adulten Individuum ohne Auswirkung auf neuroendokrine Funktionen oder Persönlichkeitseigenschaften waren.

6 Literaturverzeichnis

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990): Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402.
- Asghari, V., Schoots, O., van Kats, S., Ohara, K., Jovanovic, V., Guan, H.C., Bunzow, J.R., Petronis, A. & Van Tol, H.H. (1994): Dopamine D4 receptor repeat: analysis of different native and mutant forms of the human and rat genes. *Molec Pharmacol* 46: 364-373
- Arinami, T., Gao, M., Hamaguchi, H. & Toru, M. (1997): A functional polymorphism in the promoter region of the dopamine D2 receptor gene is associated with schizophrenia. *Hum Molec Genet* 4: 577-582
- Ballidin, J.I., Berggren, U.C. & Lindstedt, G. (1992): Neuroendocrine evidence for reduced dopamine receptor sensitivity in alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res* 16: 71-74
- Barnes, W.M., (1992): The fidelity of Taq polymerase catalyzing PCR is improved by an N-terminal deletion. *Gene* 112: 29-35
- Barr, D.L. & Kidd, K.K. (1993): Population frequencies of the A1 Allele at the dopamine D₂ receptor locus. *Biol Psychiatry* 34: 204-209
- Braun, W.E (1979): HLA and Disease. CRC, Boca Raton FL.
- Benjamin, J., Lin, L., Patterson, C., Greenberg, B.D., Murphy, D.L. & Hamer, D.H. (1996): Population and familial association between the D4 dopamine receptor gene and measures of Novelty Seeking. *Nature Genet* 12: 81-84
- Benkert, O. & Hippus, H. (1996): Psychiatrische Pharmakotherapie. 6. Auflage; Berlin, Heidelberg, New York, Springer Verlag
- Blum, K., Noble, E.P., Sheridan, P.J., Montgomery, A., Ritchie, T., Jagadeeswaran, P., Nogami, H., Briggs, A.H. & Cohn, J.B. (1990): Allelic association of human dopamine D₂ receptor gene in alcoholism. *JAMA* 263: 2055-2060
- Blum, K., Sheridan, P.J., Wood, R.C., Braverman, E.R., Chen, T.J.H. & Comings D.E. (1995): Dopamine D2 receptor gene variants: association and linkage studies in impulsive-addictive-compulsive behaviour. *Pharmacogenetics* 5: 123-141
- Blum, K., Cull, J.G., Braverman, E.R. & Comings, D.E. (1996): Reward Deficiency Syndrome. *American Scientist*, 84: 132-145
- Bolos, A.M., Dean, M., Luca-Derse, S., Ramsburg, M., Brown, G.L. & Goldman D. (1990): Population and pedigree studies reveal a lack of association between the dopamine D₂ receptor gene and alcoholism. *JAMA* 264: 3156-3160

- Buck, K.J., Metten, P., Belknap, J.K. & Crabbe, J.C. (1997): Quantitative trait loci involved in genetic predisposition to acute alcohol withdrawal in mice. *J Neuroscience* 17: 3946-3955
- Bunzow, J.R., Tol, H.H.M. van, Grandy, D.K. et al. (1988): Cloning and expression of a rat D₂ dopamine receptor cDNA. *Nature* 336: 783-787
- Burmeister, M. (1999): Basic concepts in the study of diseases with complex genetics. *Biol Psychiatry* 45: 522-532
- Byerley, W., Hoff, M., Holik, J., Caron, M. and Giros, B. (1993): VNTR polymorphism for the human dopamine transporter gene (DAT1). *Hum Mol Genet.* 335
- Carlsson, A., Hansson, L.O., Waters, N. & Carlsson, M.L. (1997): Neurotransmitter aberrations in schizophrenia: new perspectives and therapeutic implications. *Life Sci* 61: 75-94
- Cha, R.S and Thilly, W.G., (1993): *PCR Methods Appl* 3: 18-29
- Cha, J.H., Kosinski, C.M., Kerner, J.A., Alsdorf, S.A., Mangiarini, L., Davies, S.W., Penney, J.B., Bates, G.P. & Young, A.B. (1998): Altered brain neurotransmitter receptor in transgenic mice expressing a portion of an abnormal human huntington disease gene. *Prog Natl Acad Sci USA* 95: 6480-6485
- Chang, F.-M., Kidd, J.R., Livak, K.J., Pakstis, A.J. & Kidd, K.K. (1996): The world-wide distribution of allele frequencies at the human dopamine D4 receptor locus. *Hum Genet* 98: 91-101
- Cheng, S., Fockler, C., Barnes, W.M. & Higuchi, R. (1994): Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 5695-5699
- Chichon, S., Nöthen, M.M., Rietschel, M., Körner, J. & Propping, P. (1994): Single-strand conformation analysis (SSCA) of the dopamine D1 receptor gene (DRD1) reveals no significant mutation in patients with schizophrenia and manic depression. *Biol Psychiatry* 36: 850-853
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal-Biochem* 162: 156-159
- Cloninger, C.R.(1987a): A systematic method for clinical description and classification of personality variants: a proposal. *Arch Gen Psychiatry* 44: 573-588
- Cloninger, C.R.(1987b): Neurogenetic adaptive mechanisms in alcoholism. *Science* 236: 410-416
- Cloninger, C.R., Svrakic, D.M. & Przybeck, T.R. (1993): A psychobiological model of temperament and character. *Arch Gen Psychiatry* 50: 975-990
- Cloninger, C.R.: The genetics and psychobiology of the seven-factor model of personality. In: Silk, D.R. (Ed): *Biology of personality disorders*. American psychiatric press, Inc. Washington 1998, Capture 3: 68

- Collins, D.W. & Jukes, T.H (1994): Rates of transition and transversion in coding sequences since the human-rodent divergence. *Genomics* 20: 386-396
- Comings, D.E., Domings, B.G., Muhleman, D., et al. (1991): The dopamine D₂ receptor locus as a modifying gene in neuropsychiatric disorders. *JAMA* 266: 1793-1800
- Comings, D.E., Wu, S., Chiu, C., Ring, R.H., Gade, R., Ahn, MacMurray J.P., Dietz G. & Muhleman, D. (1997): Polygenetic inheritance of Tourette syndrome, stuttering, attention deficit hyperactivity, conduct, and oppositional defiant disorder: the additive and subtractive effect of the three dopaminergic genes-DRD2, D beta H, and DAT1. *Am J Med Genet* 67: 264-88
- Comings, D.E., Gade, R., Wu, S., Chiu, C., Dietz, G., Muhleman, D., Saucier, G., Ferry, L., Rosenthal, R.J., Lesieur, H.R., Rugle, L.J. & MacMurray P. (1997): Studies of the potential role of the dopamine D₁ receptor gene in addictive behaviors. *Mol Psychiatry* 2: 44-56
- Cook, E.H., Stein, M., Krasowski, M.D. Cox, N.J., Olkon, D.M., Kieffer, J.E. & Leventhal B.L. (1995): Association of attention-deficit disorder and the dopamine transporter gene. *Am J Hum Genet* 56: 993-998
- Cooper, N.D., Krwczak, M. & Antonorakis, S.E. (1995): In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.A. & Valle, D.: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 7th edition, McGraw-Hill, New York, S. 259-291
- Cowley, D.S., Roy-Byrne, P.P., Greenblatt, D.J., Kramer, G.L. & Petty, F. (1996): Effect of diazepam on plasma gamma-aminobutyric acid in sons of alcoholic fathers. *Alcohol Clin Exp Res* 20: 343-347
- Crabbe, J.C., Young, E.R., Deutsch, D.M., Tam, B.R. & Kosobud A. (1987): Mice genetically selected for differences in open-field activity after ethanol. *Pharmacol Biochem Behav* 27: 577-581
- Crabbe, J.C., Belknap, J.B. & Buck, K.J. (1994): Genetic animal models of alcohol and drug abuse. *Science* 264: 1715-1723
- Dal Toso, R., Sommer, B., Ewer, M., Herb, A., Pritchett, D.B., Bach, A., Shivers B.D. & Seeburg P.H. (1989): The dopamine D₂ receptor: two molecular forms generated by alternative splicing. *EMBO J* 8: 4025-4034
- Daly, G., Hawi, Z., Fitzgerald, M. & Gill, M. (1999): Mapping susceptibility loci in attention deficit hyperactivity disorder: preferential transmission of parental alleles at DAT1, DBH and DRD5 to affected children. *Mol Psychiatry* 4: 192-196
- Dean, M., Carrington, M., Winkler, C., Huttley, G.A., Smith, W., Allikmets, R., Goedert, J.J., Buchbinder, S.P., Vittinghoff, E., Bomperts, E., Donfield, S. et al. (1996): Genetic restriction of HIV-1 infection an progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. *Science* 273: 1856-1862
- Dearry, A., Gingrich, J.A., Falardeau, P., Freneau, R.T., Bates, M.D. & Caron, M.G. (1990): Molecular cloning and expression of the gene for a human D₁ dopamine receptor. *Nature* 347: 72-76

- Di Chiara, G. & Imperato A. (1988): Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 5274-5278
- Di Chiara, G. (1995): The role of dopamine in drug abuse viewed from the perspective of its role in motivation. *Drug Alc Dependence* 38: 95-135
- Duaux, E., Gorwood, P., Griffon, N., Bourdel, M-C, Sautel, F., Sokoloff, P., Schwartz, J-C., Ades, J., Lôo, H. & Poirier, M-F. (1998): Homozygosity at the dopamine D₃ receptor gene is associated with opiate dependence. *Mol Psychiatry* 3, 333-336
- Dubertret, C., Gorwood, P., Ades, J., Feingold, J., Schwartz, J.C. & Sokoloff, P. (1998): Meta-analysis of DRD3 gene and schizophrenia: ethnic heterogeneity and significant association in Caucasians. *Am J Med Genet* 81: 318-22
- Ebstein, R.P. Novick, O., Umansky, R., Priel, B., Osher, Y., Blaine D., Bennett, E.R., Nemanov, L., Katz, M. & Belmaker, R.H. (1996): Dopamine D4 receptor (DRD4) exon III polymorphism associated with the human personality trait of novelty seeking. *Nature Genet* 12: 78-80
- Ebstein, R.P., Nemanov, L., Klotz, I., Gritsenko, I. & Belmaker, R.H. (1997): Additional evidence for an association between the dopamine D4 receptor (D4DR) exon III repeat polymorphism and the human personality trait of novelty seeking. *Mol Psychiatry* 2: 472-477
- Ebstein, R.P., Segman, R., Benjamin, J., Osher, Y., Nemanov, L. & Belmaker, R.H. (1997): 5-HT_{2C} HTR2C Serotonin receptor gene polymorphism associated with the human personality trait of reward dependence: interaction with dopamine D4 receptor (D4DR) and dopamine D3 receptor (D3DR) polymorphisms. *Am J Med Genet* 74: 65-72
- Edenberg, H.J., Foroud E., Koller, D.L., Goate, A., Rice, J. Van Eerdewegh, P., Reich T., Cloninger, C.R., Nurnberger, J.I., Kowiczuk, M., Wu, B., Li T.-K., et al. (1998): A family-based analysis of the association of the dopamine D2 receptor (DRD2) with alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res* 22: 505-512
- Essman, W.D., Luedtke, R.R., McGonigle, P. & Lucki, I. (1995): Variations in the behavioral responses to apomorphine in different strains of rats. *Behavioral Pharmacology* 6: 4-15
- Finckh, U., Rommelspacher, H., Kuhn, S., Dufeu, P., Otto, G., Heinz, A., Dettling, M., Giraldo-Velasquez, M., Pelz, J., Gräf, K.J., Harms, H., Sander, T., Schmidt, L.G. & Rolfs, A. (1997): Influence of the dopamine D2 receptor (DRD2) genotype on neuroadaptive effects of alcohol and the clinical outcome of alcoholism. *Pharmacogenet* 7: 271-281
- Faraone, S.V. & Biederman, J. (1998): Neurobiology of attention-deficit hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 44: 951-8
- Fishburn, C.S., Bellili, D., David, C., Carmon, S. & Fuchs, S. (1993): A novel short isoform of the D3 dopamine receptor generated by alternative splicing in the third cytoplasmic loop. *J Biol Chem* 268: 5872-5878

- Gandelmann, K.Y., Harmon, S., Todd, R.D. & O'Malley K.L. (1991): Analysis of the structure and expression of the human dopamine D_{2A} receptor gene. *J Neurochem* 56: 1024-1029
- Garris, P.A., Kilpatrick, M., Bunin, M.A., Michael, D., Walker, Q.D. & Wightman, M. (1999): Dissociation of dopamine release in the nucleus accumbens from intracranial self-stimulation. *Nature* 398: 67-69
- Geijer, T., Jönsson, E., Neiman, J., Persson, M.-L., Brené, S., Gyllander, A., Sevall, G., Rydberg, U., Wasserman, D. & Terenius, L. (1997). Tyrosine hydroxylase and dopamine D₄ receptor allelic distribution in Scandinavian chronic alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 21: 35-39
- Gelernter, J., O'Malley S., Risch, N., Kranzler, H.R., Krystal, J., Merikangas, K., Kennedy, J.L. & Kidd, K.K. (1991): No association between an allele at the D₂ dopamine receptor gene (DRD2) and alcoholism. *JAMA* 266: 1801-1807
- Gelernter, J., Goldmann, D. & Risch, N. (1993): The A1 allele at the D₂ dopamine receptor gene and alcoholism. A reappraisal. *JAMA* 269: 1673-1677
- Gelernter, J. & Kranzler, H. (1999): D₂ dopamine receptor gene (DRD2) allele and haplotype frequencies in alcohol dependent and control subjects: no association with phenotype or severity of phenotype. *Neuropsychopharmacology* 20: 640-649
- George, D.T., Nutt, D.J., Rawlings, R.R., Phillips, M.J., Eckardt, M.J., Potter, W.Z. & Linnoila, M. (1995): Behavioral and endocrine responses to clomipramine in panic disorder patients with or without alcoholism. *Biol Psychiatry* 37: 112-119
- Gessa, G.L., Muntoni, F., Collu, F., Vargiu, L. & Mereu, G. (1985): Low doses of ethanol activate dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. *Brain Res* 348: 201-204
- Gill, M., Daly, G., Heron, S., Hawi, Z. & Fitzgerald, M. (1997): Confirmation of association between attention deficit hyperactivity disorder and a dopamine transporter polymorphism. *Mol Psychiatry* 2: 311-313
- Gilligan, S.B., Reich, T. & Cloninger, C.R. (1988): Alcohol-related symptoms in heterogeneous families of hospitalized alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 12: 671-678
- Gingrich, J.A. and Caron, M.G. (1993): Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors. *Annu Rev Neurosci* 16: 299-321
- Giros, B., Sokoloff, P., Matres, M.P., Riou J.F., Emorine, L.J. & Schwartz, J.C. (1989): Alternative splicing directs the expression of two D₂ dopamine receptor isoforms. *Nature* 342: 923-926
- Goodwin, D. (1976): Is alcoholism hereditary? New York: Oxford Univ. Press
- Gorwood, P., Martres, M.P., Adés, J., Sokoloff, P., Noble, E.P., Geijer, T., Blum, K., Neiman, J., Jönsson, E., Feingold, J. & Schwartz J.C. (1995): Lack of association between alcohol-dependence and D₃ dopamine receptor gene in three independent samples. *Am J Med Genet* 60: 529-531

- Gandy, D.K., Zhou, Q.-Y., Allen, L., Litt, R., Magenis, R.E., Civelli, O. & Litt, M. (1990): A human D(1) dopamine receptor gene is located on chromosome 5 at q35.1 and identifies an EcoRI RFLP. *Am J Hum Genet* 47: 828-834
- Grandy, D. K., Zhang, Y. & Civelli, O. (1993): PCR detection of the TaqA RFLP at the DRD2 locus. *Hum Mol Genet* 2: 2197
- Greenbaum, I.E., Li, W., Cressman, D.E., Peng, Y., Ciliberto, G., Poli, V. & Taub, R. (1998): CCAAT enhancer-binding protein beta is required for normal hepatocyte proliferation in mice after partial hepatectomy. *J Clin Invest* 102: 996-1007
- Gross, E., Arnold, N., Goette, J., Schwarz-Boeger, U. & Kiechle, M. (1999): A comparison of BRCA1 mutation analysis by direct sequencing, SSCP and DHPLC. *Hum Genet* 105: 72-78
- Havemann, U., Magnus, B., Möller, H.G. & Kuschinsky, K. (1986): Individual and morphological differences in the behavioural response to apomorphine in rats. *Psychopharmacology* 90: 40-48
- Havemann, U. (1988): Does individually different sensitivity to dopaminergic stimulation determine the degree of tolerance and dependence to opioids? *Pharmacopsychiatry* 21: 314-316
- Hawi, Z., McCrabe, U., Straub, R.E., O'Neill, A., Kendler, K.S., Walsh, D. & Gill, M. (1998): Examination of new and reported data of the DRD3/Mscl polymorphism: no support for the proposed association with schizophrenia. *Mol Psychiatry* 3: 150-155
- Hayashi, K. (1991): PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Methods Applic* 1: 34-38
- Heinz, A., Dettling, M., Kuhn, S., Dfeu, P., Gräf, K.J., Kürten, I., Rommelspacher, H. & Schmidt, L.G. (1995): Blunted growth hormone response is associated with early relapse in alcohol-dependent patients. *Alcohol Exp Clin Res* 19: 61-65
- Heinz, A., Sander, T., Harms, H., Finckh, U., Kuhn, S., Dufeu, P., Dettling, M., Gräf, K., Rolfs, A., Rommelspacher, H & Schmidt, L.G. (1996): Lack of allelic association of dopamine D1 and D2 (TaqIA) receptor gene polymorphisms with reduced dopaminergic sensitivity in alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res* 20: 1109-1113
- Helmste, D.M. (1983): Spontaneous and apomorphine-induced locomotor changes parallel dopamine receptor differences in two rat strains. *Pharmacol Biochem Behav* 19: 153-155
- Ichise, M., Kim, Y.J., Erami, S.S., Ballinger, J.R., Vines, D., Tanaka, F. & Lang, A.E. (1999): Functional morphometry of the striatum in Parkinson's disease on three-dimensional surface display of 123I-beta-CIT SPECT data. *J Nucl Med* 40: 530-538
- Imperato, A. & Di Chiara, G. (1986): Preferential stimulation of dopamine release in the nucleus accumbens of freely moving rats by ethanol. *J Pharmacol Exp Ther* 239: 219-228
- Itokawa, M., Arinami, T., Futamura, N., Hamaguchi, H. & Toru, M. (1993): A structural polymorphism of human dopamine D2 receptor, D2 (Ser311-Cys). *Biochem Biophys Res Commun* 196 (6): 1369-1375

- Jönsson, E.G., Nöthen, M.M., Gustavsson, J.P., Neidt, H., Brene, S., Tylec, A., Propping, P. & Sedvall, G. (1997): Lack of evidence for allelic association between personality traits and the dopamine D4 receptor gene polymorphisms. *Am J Psychiatry* 154: 697-699
- Kaplan, H.I. & Sadock, B.J. (1998): Kaplan and Sadock's synopsis of psychiatry: behavioral sciences, clinical psychiatry; 8th edition, Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, USA: S. 541
- Khan, Z.U., Mrzljak, L., Gutierrez, A., Calle de la, A. & Goldman-Rakic, P.S. (1998): Prominence of the dopamine D2 short isoform in dopaminergic pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7731-7736
- Kebabian, J. W. & Calne, D. B. (1979): Multiple receptors for dopamine. *Nature* 227: 92-69
- Kelly, P.H., Seviour, P.W. & Iversen, S.D. (1995): Amphetamine and apomorphine responses in the rat following 6-OHDA lesions of the nucleus accumbens septi and corpus striatum. *Brain Res* 94: 507-522
- Kelly, M.A., Rubinstein, M., Phillips, T.J., Lessov, C.N., Burkhart-Kasch, S., Zhang, G., Bunzow, J.R., Fang, Y., Gerhardt, G.A., Grandy, D.K. & Low, M.J. (1998): Locomotor activity in D2 dopamine receptor-deficient mice is determined by gene dosage, genetic background, and developmental adaptations. *J Neuroscience* 18: 3470-3479
- Kendler, K.S., Gruenberg, A.M. & Kinney, D.K. (1994): Independent diagnoses of adoptees and relatives as defined by DSM-III in the provincial and national samples of the Danish Adoption Study of Schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 51: 456-486
- Kety, S.S., Wender, P.H., Jacobsen B., Ingraham, L.J., Jansson, L. Faber, B. & Kinney, D.K. (1994): Mental illness in the biological and adoptive relatives of schizophrenic adoptees. Replication of the Copenhagen Study in the rest of Denmark. *Arch Gen Psychiatry* 51: 442-455
- Klein, C., Brin, M.F., Kramer, P., Sena-Esteves, M., de Leon, D., Doheny, D., Bressman, S., Fahn, S., Breakefield, X.O. & Ozelius, L.J. (1999): Association of a missense change in the D2 dopamine receptor with myoclonus dystonia. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 5173-5176
- Kotler, M., Cohen, H., Segman, R., Gritsenko, I., Nemanov, L., Lerer, B., Kramer, I., Zer-Zion, M., Kletz, I. & Ebstein, R.B. (1997): Excess dopamine D4 receptor (DRD4) exon III seven repeat allele in opioid-dependent subjects. *Mol Psychiatry* 2: 251-254
- Krebs, M.O., Sautel, F., Bourdel, M.C., Sokoloff, P., Schwartz, J.C., Olie, J.P., Loo, H. & Poirier, M.F. (1998): Dopamine D3 receptor gene variants and substance abuse in schizophrenia. *Mol Psychiatry* 3: 337-341
- Kunugi, H., Kawada Y., Tatsumi, M., Sasaki, T. & Nanko, S. (1996): Manic-depressive illness and tyrosine hydroxylase gene. *Lancet* 348: 336
- La Hoste, G.J., Swanson, J.M., Wigal, S.B., Glabe, C, Wigal, T., King, N. & Kennedy, J.L. (1996): Dopamine D4 receptor gene polymorphism is associated with attention deficit hyperactivity disorder. *Mol. Psychiatry* 1: 121-124

- Lander, E.S. & Schork N.J. (1994): Genetic dissection of complex traits. *Science* 265: 2037-2048
- Lal, S. (1988): Apomorphine in the evaluation of dopaminergic function in man. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 12: 117-164
- Lannfeldt, L., Sokoloff, P., Martres, M.P., Pilon, C., Giros, B., Jönsson, E., Sedvall, G. & Schwartz J.C. (1992): Amino acid substitution in the dopamine D₃ receptor as a useful polymorphism for investigating psychiatric disorders. *Psychiatr Genet* 2: 249-256
- Lawford, B.R., Youg, R.M., Rowell, J.A., Qualichefski, J., Fletcher, B.H., Syndulko, R., Ritchie, T. & Noble, E.P. (1995): Bromocriptine in the treatment of alcoholics with the D₂ dopamine receptor A1 allele. *Nat Med* 1: 337-341
- Lawford, B.R., Young, R.McD., Rowell, J.A., Gibson, J.N., Feeney, G.F.X., Ritchie, T.L., Syndulko, K. & Noble, E.P. (1997): Association of the D₂ dopamine receptor A1 Allele with alcoholism: medical severity of alcoholism and type of controls. *Biol Psychiatry* 41: 386-393
- Lesch, K.P., Bengel, D., Heils, A., Sabol, S.Z., Greenberg, B.D., Petri, S., Benjamin, J., Muller, C.R., Hammer, D.H. & Murphy, D.L. (1996): Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science* 274: 1527-1531
- Lewis, M.H., Baumeister, A.A., McCorkle, D.L. & Mailman, R.B. (1985): A computer supported method for analyzing behavioral observations: studies with stereotypy. *Psychopharmacology* 85: 204-209
- Li, T., Xu, K., Deng, H., Cai, G., Liu, X., Wang, R., Xiang, X., Zhao, J., Murray, R.M., Sham, P.C. & Collier, D.A. (1997): Association analysis of the dopamine D4 gene exon III VNTR and heroin abuse in Chinese subjects. *Mol Psychiatry* 2: 413-416
- Lichter, J.B., Barr, C.L., Kennedy, J.L., Van Tol, H.H.M., Kidd, K.K., & Livak, K.J. (1993): A hypervariable segment in the human dopamine receptor D₄ (DRD4) gene. *Hum Mol Genet* 2: 767-773
- Leboyer, M., Malafosse, A., Boularand, S., Campion, D., Gheysen, F., Samolyk, D., Henriksson, B., Denise, E., des Lauriers, A. & Lepine, JP (1990): Tyrosine hydroxylase polymorphisms associated with manic-depressive illness. *Lancet* 19: 1219
- Lee, L.G., Connell, C.R., Woo, S.L., Cheng, R.D., McArdle, B.F., Fuller, C.W., Halloran, N.D. & Wilson, R.K. (1992): DNA sequencing with dye-labeled terminators and T7 DNA polymerase: effects of dyes and dNTPs on incorporation of dye-terminators and probability analysis of termination fragments. *Nucleic Acids Res* 20: 2471-2483
- Long, J.C., Knowler, W.C., Hanson, R.L., Robin, R.W., Urbanek, M., Moore, E., Bennett, P.H. & Goldman, D. (1998): Evidence for genetic linkage to alcohol dependence on chromosomes 4 and 11 from an autosome-wide scan in an American Indian population. *Am J Med Genet* 81: 216-221
- Lüdecke, B. & Bartholomé, K. (1995): Frequent sequence variants in the human tyrosin hydroxylase gene. *Hum Genet* 95: 716

- Luedtke, R.R., Artymyshyn, R.P., Monks, B.R. & Molinoff, P.R. (1992): Comparison of the expression, transcription and genomic organization of D₂ dopamine receptors in outbred and inbred strains of rat. *Brain Research* 584: 45-54
- Malhotra A.K., Virkkunen, M., Rooney, W., Eggert, M., Linnoila, M. & Goldman, D. (1996): The association between the dopamine (D4DR) 16 amino acid repeat polymorphism and novelty seeking. *Mol Psychiatry* 1:388-391
- McClearn, G.E. & Kahihana, R. (1981): Selective breeding für ethanol sensitivity: Short-sleep and long-sleep mice. In McClearn, G.E., Deitrich, R.A. & Erwin, V.G., eds. Development of animal models as pharmacogenetic tools. NIAAA Research Monograph No.6 DHEW Pub. No. (ADM) 79-847. Washington, DC: Supt. of Docs., U.S. Govt. Print. Off.
- McCrae, R.R., & Costa, P.T. Jr (1987): Validation of the five-factor model of personality across instruments and observers. *J Pers Soc Psychol* 52: 81-90
- McGue, M., Pickens, R.W. & Svikis, D.S. (1992): Sex and age effects on the inheritance of alcohol problems: A twin study. *J Abnorm Psychol* 101: 3-17
- Minowa, T., Minowa, M.T. & Mouradian, M.M. (1992): Analysis of the promoter region of the rat D₂ dopamine receptor. *Biochemistry*. 31: 8389-8396
- Mohn, A.R., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G. & Koller, B.H. (1999): Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. *Cell* 98: 427-436
- Monsma, F.J., McVittie, L.D., Gerfen, C.R. & Mahan, L.C. (1989): Multiple D₂ dopamine receptors produced by alternative RNA splicing. *Nature* 342: 926-929
- Muramatsu, T. & Higuchi, S. (1995): Dopamine transporter gene polymorphism and alcoholism. *Biochem Biophys Res Commun* 211: 28-32
- O'Malley, K.L., Mack, K.J., Gandelman, K.Y. & Todd, R.D. (1990): Organization and expression of the rat D_{2A} receptor gene: Identification of alternative transcripts and a variant donor splice site. *Biochemistry* 29: 1367-1371
- Orita, M., Suzuki, Y., Skiya, T. & Hayashi, K. (1989): Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using polymerase chain reaction. *Genomics* 5: 874-879
- Owen, M.J., Holmans, P. & McGuffin, P. (1997): Association studies in psychiatric genetics. *Mol Psychiatry* 2: 270-273
- Noble, E.P., Blum, K., Ritchie, T., Montgomery, A. & Sheridan, P.J. (1992): Allelic association of the D₂ dopamine receptor gene with receptor-binding characteristics in alcoholism. *Arch Gen Psychiatry* 48: 648-655
- Noble, E.P., Zhang, X., Ritchie, T., Lawford, B.R., Grosser, S.C., Youg, R.M. & Sparkes, R.S. (1998): D₂ dopamine receptor and GABA (A) receptor beta3 subunit genes and alcoholism. *Psychiatry-Res* 16, 81: 133-147

- Ouchi, Y., Yoshikawa, E., Okad, H., Futatsubashi, M., Sekine, Y., Iyo, M. & Sakamoto, M. (1999): Alterations in binding site density of dopamine transporter in the striatum, orbitofrontal cortex, and amygdala in early Parkinson's disease: compartment analysis for beta-CFT binding with positron emission tomography. *Ann Neurol* 45:601-610
- Pagliusi, S., Chollet-Daemerius, A., Losberger, C., Mills, A. & Kawashima, E. (1993): Characterization of a novel exon within the D3 receptor gene giving rise to an mRNA isoform expressed in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 194, 465-471
- Pao, C.I., Zhu, J.L. Robertson, D.G., Lin K.W., Farmer, P.K., Begovic, S., Wu, G.J. & Phillips, L.S. (1995): Transcriptional regulation of the rat insulin-like growth factor-I gene involves metabolism-dependent binding of nuclear proteins to a downstream region. *J Biol Chem* 270: 24917-23
- Parsian, A. & Zhang, Z.H. (1997): Human dopamine transporter gene polymorphism (VNTR) and alcoholism. *Am J Med Genet* 74: 480-482
- Pauling, L., Itano, H.A., Singer, S.J. & Wells I.C. (1949): Sickle cell anemia: A molecular disease. *Science* 110: 543
- Perez de Castro, I., Ibanez, A., Torres, P., Saiz-Ruiz, J. & Fernandes-Piqueras, J. (1997): Genetic association study between pathological gambling and a functional DNA polymorphism at the D4 receptor gene. *Pharmacogenetics* 7: 345-348
- Pickens, R.W., Svikis, D.S., McGue, A., Lykken, D.T., Jesten, L.L. & Clayton, P.J.: Heterogeneity in the inheritance of alcoholism: A study of male and female twins. *Ach Gen Psychiatry* 48: 19-28
- Richter, J., Bollow, K., Cloninger, C.R. & Przybeck, T. (1997): Erste Erfahrungen mit der deutschen Version des Temperament- und Charakter-Inventars (TCI-Selbsteinschätzung). *Verhaltenstherapie und -medizin* 18: 95-110
- Rosetti, Z.L., Hmaidan, Y. & Gessa, G.L. (1992): Marked inhibition of mesolimbic dopamine release: a common feature of ethanol, morphine, cocaine and amphetamine abstinence in rats. *Eur J Pharmacol* 221: 531-537
- Rots, N.Y, Cools, A.R., Béro, A., Voorn, P., Rostène, W. & de Kloet, E.R. (1996): Rats bred for enhanced apomorphine susceptibility have elevated tyrosine hydroxylase mRNA and dopamine D₂-receptor binding sites in nigrostriatal and tuberoinfundibular dopamine systems. *Brain research* 710: 189-196
- Samson, M., Libert, F., Coranz, B.J., Ruckler, J., Liesnard, C., Farber, C.M., Sargosti, W., Lapoumeroulie, C., Cognaux, J., Forceille, C. et al. (1996): Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 382: 722-725
- Sander, T., Harms, Dufeu, P., Kuhn, S., A., Rommelspacher, H. & Schmidt, L.G. (1997a): Dopamine D4 receptor exon III alleles and variation of novelty seeking in alcoholics. *Am J Med Genet* 74: 483-487

- Sander, T., Harms, H., Podschus, J., Finckh, U., Nickel, B., Rolfs, A., Rommelspacher, H. & Schmidt, L.G. (1997b): Allelic association of a dopamine transporter gene polymorphism in alcohol dependence with withdrawal seizures of delirium. *Biol Psychiatry* 41: 299-304
- Sander, T., Ladehoff, M., Samochowiec, J., Finckh, U., Rommelspacher, H. & Schmitdt L.G. (1999): Lack of an allelic association between polymorphisms of the dopamine D2 receptor gene and alcohol dependence in the German population. *Alcohol Clin Exp Res* 23: 578-581
- Sanger, F., Nickeln, A.R. & Coulsen, A.R. (1977): DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 5463-5467
- Sano, A., Kondoh, K., Kakimoto, Y., & Kondo, I. (1993): A 40-nucleotide repeat polymorphism in the human dopamine transporter gene. *Hum Genet* 91: 405-406
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis K.B., & Ehrlich, H.A. (1988): Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491
- Schmidt, L.G., Harms, M.D., Kuhn, S., Rommelspacher, M.A.H. & Sander, T. (1998): Modification of alcohol withdrawal by the A₉ allele of the dopamine transporter gene. *Am J Psychiatry* 155: 474-478
- Scott, A.W., Griffin, S.A. & Luedtke, R.R. (1995): Genetic polymorphisms at the rat and murine loci coding for dopamine D2-like receptors. *Mol Brain Reseach* 29: 347-357
- Seeman, P., Niznik, H.B., Guan, H.C., Booth, G. & Ulpian, C. (1989): Link between D1 and D2 dopamine receptors is reduced in schizophrenia and Huntington diseased brain. *Prog Natl Acad Sci USA* 86: 10156-10160
- Segman, R., Neeman, T., Heresco-LevyU., Finkel, B., Karagichev, L., Schlafman, M., Dorevitch, A., Yakir, A., Lerner, A., Shelevoy, A. & Lerer, B. (1999): Genotypic association between the dopamine D3 receptor and tardive dyskinesia in chronic schizophrenia. *Mol Psychiatry* 4: 247-253
- Seretti, A., Macciardi, F., Cusin, C., Verga, M., Pedrini, S. & Smeraldi, E. (1998): Tyrosine hydroxylase gene in linkage disequilibrium with mood disorders. *Mol Psychiatry* 3: 169-174
- Seretti, A., Macciardi, F., Cusin, C., Lattuada, E., Lilli, R. & Smeraldi, E. (1998): Dopamine receptor D4 gene is associated with delusional symptomatology in mood disorders. *Psychiatry Res* 80: 129-136
- Sibley, D. R. and Monsma, F.J.Jr (1992): Molecular biology of dopamine receptors. *Trends Pharmacol Sci* 13: 61-69
- Sigvardsson, S., Bohman, M. & Cloninger, R. (1996): Replication of the Stockholm adoption study of alcoholism. *Arch Gen Psychiatry* 53: 681-687
- Smeraldi, E., Zanardi, R., Benedetti, F., Di Bella, D., Perez, J. & Catalano, M. (1998): Polymorphism within the promoter of the serotonin transporter gene and antidepressant efficacy of fluvoxamine. *Mol Psychiatry* 3: 508-511

- Sokoloff, P., Giros, B., Martres, M-P., Bouthenet M-L. & Schwartz J.C. (1990): Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D₃) as a target for neuroleptics. *Nature* 347: 146-151
- Spielmann, R.S. & Ewans W.J. (1996): The TDT and other family-based tests for linkage disequilibrium and association. *Am J Hum Genet* 59: 983-989
- Steen, V.M., Lovelie, R., MacEwan, T. & McCradie, R.D. (1997): Dopamine D3 receptor gene variant and susceptibility to tardive dyskinesia in schizophrenic patients. *Mol Psychiatry* 2: 139-145
- Strobel, A., Wehr, A., Michel, A. & Brocke, B. (1999): Association between the dopamine D4 receptor (DRD4) exon III polymorphism and measures of Novelty Seeking in a German population. *Mol Psychiatry* 4, 378-384
- Sullivan, P.F., Fifield, W.J., Kennedy, M.A., Mulder, R.T., Sellman J. D., Joyce, P.R. (1998): No association between novelty seeking and the type 4 dopamine receptor gene (DRD4) in two New Zealand samples. *Am J Psychiatry* 155: 98-101
- Sunahara, R.K., Niznik, H. B., Weiner, D. W. et al. (1990): Human dopamine D1 receptor encoded by an intronless gene on chromosome 5. *Nature* 347: 80-83
- Sunahara, R.K., Guan, H-C., O'Dowd B.F. et al. (1991): Cloning of the gene for a human dopamine D₅ receptor with higher affinity for dopamine than D₁. *Nature* 350: 614-619
- Surinya, K.H., Cox, T.C. & May, B.K (1997): Transcriptional regulation of the human erythroid 5-aminolevulinic acid synthase gene. Identification of promoter elements and role of regulatory proteins. *J Biol Chem* 272: 26585-94
- Surmann, A. and Havemann-Reinecke, U. (1995): Injection of apomorphine - a test to predict individual different dopaminergic sensitivity? *J Neural Transm* 45: 143-155
- Swanson, J.M., Sunohara, G.A. Kennedy, J.L., Regino, R., Fineberg, E., Wigal, T., Lerner, M., Williams, L., LaHoste, G.J. & Wigal, S. (1998): Association of the dopamine receptor D4 (D4DR) gene with a refined phenotype of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): a family-based approach. *Mol Psychiatry* 3: 38-41
- Tellegen, A., Lykken, D.T., Bouchard, T.J. Jr, Wilcox, K.J., Segal, N.L. & Rich, S. (1988): Personality similarity in twins reared apart and together. *J Pers Soc Psychol* 54: 1031-1039
- Terwilliger, J. & Ott, J. (1992): A haplotype-based "Haplotype Relative Risk" approach to detecting allelic associations. *Hum Hered* 42: 337-346
- Thomas, K.L., Rose, S., Jenner, P. & Marsden, C.D. (1992): Acute reserpine treatment induces down regulation of D-1 dopamine receptor associated adenylyl cyclase activity in rat striatum. *Biochem Pharmacol* 44: 83-91
- Tiihonen, J., Kuikka, J., Bergstrom, K., Hakola, P., Karhu, J., Ryyanen O.-P. & Fohr, J. (1995): Altered striatal dopamine re-uptake site densities in habitually violent and non-violent alcoholics. *Nature Med* 1: 654-657
- Todd, R.D., Lobos, E.A., Parsian, A., Simpson, S. & DePaulo, J.R. (1996): Manic depressive illness and tyrosine hydroxylase markers. *Lancet* 347: 1634

- Tol, H.H.M. van, Bunzow, J.R., Guan, H.C., Sunahara, R.K., Seeman, P., Nuznik, H.B. & Civelli, O. (1991): Cloning of the gene for a human dopamine D₄ receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature* 350: 60-614
- Tol, H.H.M. van, Wu, C.M., Guan, H.C., Ohara, K., Bunzow, J.R., Civelli, O. Kennedy, J. Seeman, P., Niznik, H.B., Jovanovic, V. et al. (1992): Multiple dopamine D₄ receptor variants in the human population. *Nature* 358: 149-152
- Turner, E., Ewing, J., Schilling, P., Smith, T.L., Irwin, M., Schuckit, M. & Kelsoe, J.R. (1992): Lack of association between an RFLP near the D₂ dopamine receptor gene and severe alcoholism. *Biol Psychiatry* 31: 285-290
- Vandenbergh, D.J., Persico, A. M. and Uhl, G.R. (1992): A human dopamine transporter cDNA predicts reduced glycosylation, displays a novel repetitive element and provides racially-dimorphic TaqI RFLPs. *Mol Brain Res* 15: 161-166
- Vandenbergh, D.J., Zonderman, A.B., Wang, J., Uhl, G.R., Costa Jr, P.T. (1997): No association between novelty seeking and dopamine D4 receptor (DRD4) exon III seven repeat alleles in Baltimore longitudinal study of aging participants. *Mol Psychiatry* 2: 417-419
- Volkow, N.D., Fowler, J.S., Wolf, A.P., Shiue, C.Y., Alpert, R., Dewey, S.L., Logan, J., Bendriem, B., Christman, D. et al. (1990): Effects of chronic cocaine abuse on post-synaptic dopamine receptors. *Am J Psychiatry* 147: 719-724
- Waddington, J.L., Daly, S.A., Downes, R.P., Deveney, A.M., McCauley, P.G. & O'Boyle, K.M. (1995): Behavioural pharmacology of "D-1-like" dopamine receptors: further subtyping, new pharmacological probes and interactions with "D-2-like" receptors. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 19: 811-831
- Waldman, I.D., Rowe, D.C., Abramowitz, A., Kozel, S.T., Mohr, J.H., Sherman, S.L., Cleveland, H.H., Sanders, M.L., Grad, J.M. & Stever, C. (1998): Association and linkage of the dopamine transporter gene and attention-deficit hyperactivity disorder in children: heterogeneity owing to diagnostic subtype and severity. *Am J Hum Genet* 63 1767-1776
- Warner, R.H. & Rosett, H.L. (1975): The effects of drinking on offspring: an historical survey of the American and British literature. *J Studies Alcohol* 36: 1395-1420
- Werder, K. von, (1998): Klinische Neuroendokrinologie. Springer Verlag Berlin, New York
- Wiesbeck, G.A., Maurer, C., Thome, J., Jakob, F. & Boening, J. (1995): Alcohol dependence, family history, and D2 dopamine receptor function as neuroendocrinologically assessed with apomorphine. *Drug Alcohol Depend* 40: 49-53
- Wise, R. A. (1988): The neurobiology of craving: implications for the understanding of addiction. *J Abnorm Psychol* 97: 118-132
- Wise, R.A. (1996): Addictive drugs and brain stimulation reward. *Annu Rev Neurosci* 19: 319-340
- Zhou, Q.-Y., Grandy, D.K., Thambi, L., Kushner, J.A., van Tol, H.H., Cone, R., Pribnow, D., Salon, J., Bunzow, J.R. & Civelli, O. (1990): Cloning and expression of human and rat D₁ dopamine receptors. *Nature* 347: 76-80

Zhou, Q.-Y., Li, C., & Civelli, O. (1992): Characterization of gene organization and promoter region of the rat dopamine D1 receptor gene. *J Neurochem* 59: 1875-1883

7 Anhang

7.1 Vergleichssequenz D1

S46131 Length: 6251 August 29, 1997 11:48 Type: N Check: 4570

```
1 GAATTCCTTTT GCTGGGGACT GGCACTGCAG GCAAAGCCAT GCCACCTGAG
51 TCAGCCTTCG TATGGCTGGC ATCCTACTTT AAAGAGCAGT GGCCATTGCC
101 CAGAGGCTTG GGGACACCTC TCCAAAGCAA AAGTCACTAG GGGAGTTTCA
151 GTCCTCAAAT CGCCCTCAGC GTCACCCCA GGTTCCTGG CTACAATCCT
201 AAGTGTACT GTATTGTTGC CTCTTTAAT TTGTGTTTGC TGGTGAAAA
251 TGAAGAAGTA TGGTGAAATA AAGCTCCAAT CGCTTAGAGA GCAACTGCCA
301 CACTGTGTGT GTGTGTGTAT GTGTGTGTAT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT
351 GGTGAGAATC CCCTCAGGTT TTACTGAA CTGACTCTAA AGCAGATGTT
401 CTCAACTTGT GAATCTTGAC CCTTTGGTGG CTGGGGGGTG GGCTCATATC
451 AGATAGTCCG TCACACATTT ACATTATAAT TCATAACAGT AACAAAATTA
501 GTTATGGGGC AGCAACAAAA TAACTTTATG GTTGGGGGTT CTCCGCCTGT
551 GGAAGTGTAT TAAAGGGTCA CAGCATTGGG GAAGTTGAGG ACCTCTGTTC
601 TTAAGGCATG GGTATATATG CTGATCACGA GTCTGTGGAA CTTGTGTGT
651 GACAGCAAGG CTGTCAGTGG GAGGGCAGAA CTGGGCGAAC GGGCGGAGGA
701 GCATCTGTGT CAATCATCTG ACTAGTACAC CCTTTCCGA GATCTGATTT
751 CTGCTGGCTA ATTAGGAGAG CTTCTTAGGC TATTTAGAGA AAATTCGAGC
801 ATTCAGTGCG GTGTATGGTT CGCATGGAAA CAAAACACT ATTTTATTTT
851 TTATTTTAAA AACTGGTCCT GGAAGAAATT TCTGGCCACC AAGGGCTGAC
901 TGAGTCCATA TCTGGTGCCC GAGTCTTAAA TAAATATCTC ATTTAATCTT
951 TCTTAAGAAG TTCTTATCAG TAAGCACGGG AGTCCAGGCA AAGAGGTTCA
1001 CAAGTTCCAT CCTCAAGCTC TTTTCACAGG GATGGGAAGA AGGTGTTGTG
1051 TCTATGCTCT AAACGTTCCC GAGGCCACAC ATTCCTGTCT CTACTTTACC
1101 CCCGTGGTAA CTGTTTAGAT GGCGGGCTCC GTTCTAGACA TGGTCGTACA
1151 AGCGACAGTC AGACAGACAG GTCACCATCC TCATTAGCTA CTGTGTTAGC
1201 GTTGAGTAGA TTTTCTGAG CATCATTTTC CACTCAGAGA AGTAGAGCCG
1251 TGCAAGCCTG TAAGGAAGGG TTTTGCAAGA TGTCGAAGGT GTGTGTGTGT
1301 GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTAT GCGCGTGCGT GCGCGCTTCG
1351 GGGACACAGA GCCTGCTGAG TTTATGCCAG GTCTCTGTTC ACTTGACAG
1401 TAAGTTGACC TGTGTGCCCC ACTGCTGCTC CAGCCTTGGC ACACAGGGGA
1451 CACAAAAGGA AAATCCTGGC TTAACGAATA AAATGCTAGC CAAAGGGACT
1501 TCCTACTCTT ATGAGTTTTT AGAAGTATTT CAAGCGAGGG AGCTCAGAGA
1551 GCGGAAGACC CGCCTCTAAT CATCCAGATT CTGGCAAGCA GGGACAGGGA
1601 AAAAAAGGG TCGAGGCCCT GTACTTTGGG GTATACACTC ACTGGTTGAG
1651 GCTTCTGTGA TCTGAACCTG CAGGGGCGCA GACGGGAGC AGGAAACCAC
1701 AGGCACCAGC AGAGGGCGTC GGTACCTGC TGAGCGTGCG GCGCCGTGTT
D1.1
```


3751 AAGCTGGCAC AAGGCAAAGC CCACATGGCC CTTGGATGGC AATTTTACCT
D1.h
3801 CCCTGGAGGA CACCGAGGAT GACAAGTGTG ACACAAGGTT GAGCAGGACG
3851 TATGCCATTT CATCGTCCCT CATCAGCTTT TACATCCCCG TAGCCATTAT
3901 GATCGTCACC TACACCAGTA TCTACAGGAT TGCCCAGAAG CAAATCCGGC
3951 GCATCTCAGC CTTGGAGAGG GCAGCAGTCC ATGCCAAGAA TTGCCAGACC
4001 ACCGAGGTA ACGGGAACCC CGTCGAATGC GCCCAGTCTG AAAGTTCCTT
4051 TAAGATGTCC TTCAAGAGGG AGACGAAAGT TCTAAAGACG CTGTCTGTGA
4101 TCATGGGGGT GTTGTGTGC TGCTGGCTCC CTTTCTTCAT CTCGAACTGT
D1.k
4151 ATGGTGCCCT TCTGTGGCTC TGAGGAGACC CAGCCATTCT GCATCGATTC
4201 CATCACCTTC GATGTGTTTG TGTGGTTTGG GTGGGCGAAT TCTTCCCTGA
D1.j
4251 ACCCCATTAT TTATGCTTTT AATGCTGACT TCCAGAAGGC GTTCTCAACC
4301 CTCTTAGGAT GCTACAGACT CTGCCCTACT ACGAATAATG CCATAGAGAC
4351 GGTGAGCATT AACACAATG GGGCTGTGGT GTTTTCCAGC CACCATGAGC
4401 CCCGAGGCTC CATCTCCAAG GACTGTAATC TGGTTTACCT GATCCCTCAT
4451 GCCGTGGGCT CCTCTGAGGA CCTGAAGAAG GAAGAGGCTG GTGGAATAGC
4501 TAAGCCACTG GAGAAGCTGT CCCAGCCTT ATCGGTCATA TTGGACTATG
4551 ACACCGATGT CTCTCTAGAA AAGATCCAAC CTGTCACACA CAGTGGACAG
4601 CATTCCACTT GAATATTGGG TCCTCATCTC TGAGGCCACG AGTTCCCTTG
D1.l
4651 GGCTTGCTGT TAAGGAATTA ACAGGAGATC CCTCTGCTGC TTTTGGACAA
D1.00
4701 TTACGAAGCT TCTCAAATC ACTGATTCCA GTGTATTCTC TAGCTTCAAG
4751 GGAAATGACT TCGGCTCTGA AATCAGTTTG GGAGTATTAT CTTAGGACAT
4801 TATAAAACAA CAACAAACAA ACAACAAAC AAACAAATAG GCCAAGAGTC
4851 AACTGTAAAC AGCTTCACTT AAAAATCGAA CTTTCCAGAA AGGAAGGGTA
4901 GGAGTTGAGT TTGCTGTCCA AACAGGTGCT AAAACTGTCC GAGCAGTTTT
4951 CAGATTGGAA AGGTAGGTGC ATGCCTTTGT TAATTAAGTT CTCCAATAAT
5001 AATTGAGCCT TACAGCAGGA GTGGGATTCC TTTTCTCAG AATTGACAGA
5051 TGCATTGTTG ATGACGGTTT TATTTATTTA TTTATTGTAC TATATGAATA
5101 TTTTAAATTT ATCATAGTGA ATCTATATTT AACATATTTA ACAGAGCAAA
5151 CCAATGTGTT ATCTGAGACT GACCTCTCCA TTTGTACTAG CACTTTATGA
5201 GCCAATGAAA CATAACGCTA GACTCTGAGA TTCTGAATTG TGAGTTACTT
5251 CTGGGAACAC AGCAAAGACT GATGTGGTGG CTCCTTAACT CGACAAGGAC
5301 ACAAAGAAAC GCAAGAGGAG AAGTGACTAA TGCCACCAAT GCTCCCCCTA
5351 AAAAGATTTT GAAAAGATTA GTTTTTTTTT TTTTTTAAAA GAAGCTACTA
5401 TTGTGTTCTG AGTGTTTTAA ATGGCAGAGG CTTTCCCCGG GGCGAATTTG
5451 CACTTCTGTA AATATCTATG TAAGAACCAG CTCAAGAGGA ATACAACTTT
5501 ATATTTCCGC TTTTGGATGG CGAGGAAGAG CATATGCCAC TTTGTATTTA
5551 TGTAACATAA TTGGCCCTCC TTGTCATTTT TCATTTTCATG CTGAAATAG
5601 CTTTCTGAAA CAAACAAATG ACTGTCCAGG CTGGAGATCT GCAGGGTGGG
5651 GAATGAGTTG TAAATTCACA GGTCACAGCA GCCCCTCCGA TAGCTGGGCT

5701 CATCATTGGT CCTTTATCTG CCCAGGTCTA ACCAAGTCGG CTGCTTAAGG
 5751 GGCTACTTTT GTAGTGCTTT AATCCGAATT TAGTATCCTC TCTTTTAAAA
 5801 AAAAAAGCTC TTTAATGTTA GTGGTAAACT AGCTAATGAA CGGTACCTCA
 5851 TCGCTGCATA ATACACTTCT GTTGGTGGGG GCGTAGACGA GCCCTTCCCG
 5901 GTGCGAGCAC CACAAAGCCA TCTGCATAGC TAGTCACAAA TGCTGTTTTT
 5951 CTTTCTCTGT GGGTTTGAAT CTAGTTTCCT TGTATCATA GCCTGGACTG
 6001 CAAAAAGATC CATCCAGTCC CCTCTTGTGG GGGCATTGCA ACAGTGTTTC
 6051 TTTTTGTTTT TGTTTTGTTF TTGAAATGTT TACAAGGTGT TCTTTGGAAG
 6101 CAGTTGCAAC ACGTGGATGG AACTGAAGAA AAGGCTGACT GGCTTGCTAA
 6151 CGGTATCTCC TGCAGGGGGT TTGTACTGCG GACTTTGAAT GTTTTCTCAG
 6201 CTCTAAGGCT TGTATGCTTT CTTACATACA ATAAACTTAT TTGTGAATT
 6251 C

7.2 Vergleichssequenz D₂

1 AATTCACCTA TATCCTCGGT GCATCTCAGA GAAATAAGCA TTGCTTGAC
 51 CAATGTGGAC CGGATGTTAA CACCTAGAGC CAGAGAGATT AAAAAATTTA
 101 ATCAACATCT ACAACTGGCA AGGGATAGAC ATAGGACACA CGACTGGGTG
 151 GAAAACGTAT AGAGGTGATG GGTGAGAAG AACAAAATCC CTGTTTAAGT
 201 AGGTTTATTC TTGGGAAGAA CATGTCCAGG GCACATAGGA AAATAGTGGG
 251 GATTCAACCA TGTCTGTAAT GTGTGAGTGC CTTAAAAGCA AATGTGAAAA
 301 ATTCTAATGT TTCTGGTAGT TCTAACACTT CCCTACCATG CCTATAGAGA
 351 GCCATGATAG ACCATACCCC AAGAATAATG AATAGGGAAG GGAGGCTAGT
 401 TCCAGTTTCT TAAATGCCTC ATAACTGGCC ACATCTAAGA AAAATGTGCT
 451 GTGTATAGGG ACTGTTCCAC TGCTGGTTCC CCGTGAGGTT TGGAGGGGCA
 501 TGCTCTTTG GGTCCCAGAT TCCACCTTG AAATCAAACA GGGGTTAGTT
 551 GAATATTAGT GTCTGTCTTT CCAACCTTAA TTTTCAGGA TTGTGTGGAT
 601 CAATGGAAGG AGTTTCTTCT TTGTGGCTAA GTGCATGACT GCCGGCTATA
 651 TGCAGACTGT CCTCTGTGCT CCGCCCTTG GAATTCTGTG GTGCCTTCTC
 701 CTTGGGACT TGAATTGGCC AATGCCGAGC TCCTGTGAGG TCTCCGGAGC
 751 TGTCGGTACT CCACAGCACC TATTTAAGCT ACAAGTATTT GGAAGACTCT
 801 ACTCTGGATT GACCCCATGC ATTCTGAATC TCATGTAGAA GCTGGCCAAG
 851 GCAGGACAGA GGGACAGAAA GCACCAGCTG GATTTGAGAA GAAGAGGATG
 901 GAAAGGGTTG TAGGTTCCCT GGGTGGGAGA TGACCCTGGA CAGGGCTGAA
 951 GAAGATCACA TTTCTCTTCC TCCTGCTCCT CAGTGCAGAC GGAAGGGTGA
 1001 GCTAGAATTT TCACGGCCTT CTTTATCATT CCCATCTTAG ATCTGCTCTG
 1051 CCCAAGTCTT CCTCTCAGAA AGCACAACAG CAGAACGAAC TGCTGTGATT
 RD2p.1
 1101 TTCAGACCTG AGGTCTGTAC ACCGACTCTG GATATCCTTC CGGAATCTAT

1151 TTCTCCTTTA AAGACTTGAT GTACCACATG TAGTGCTTCA GCTAGCCCTT
 AP1
 1201 GGCCCTGACT CCTCAAAGGA GGGGATCGAC CCGCTGGTGT TGTGATTGCT
 1251 AGACCAGAGT AGGTTTGGAT GGGCAGAGTG TTA^ACTTAAAA AGTATAGGAT
 1301 GACACCGGCG AGCAGTCCGG AGCACAGGCT ATCCCCACTC AAAGCCAGAG
 AP2
 1351 ATGGATTCTC GGTCTCAGCT CTCAAGGTTCTCTCC^CAGG CCCCACAGTG
 GATA RD2p.5 Sp1
 1401 CAGAGATAGT TCTGGGGCCC TGGGTGGGTG GGGCCTCTGT ACAAGGGGCG
 RD2p.22 Sp1
 1451 GGGTTC^CCGG GCGCCTCGTG GCCAGGGTGA CCCCGCCCC TCCTCCTGCG
 RD2p.3 Transkriptionsstart, Exon 1
 1501 CAGCGCTCTG ATTCCGCGGA GCTGTCCAGC CT^CAGTGCCG GAG
 1 CTGGTCCGCT CTTGTGCGCA GCGCCTCCTGC CCGCCTTCCC GCCTGGTCCC
 RD2p.2
 51 CGCGCTGCGC TCCCGTCCTC CCGCCCCGCC TCGTCCTGCC CCGCCGCGGC
 101 CGGTCTACTG CTCCCCGCGG GCCCGAGCCG GCCGAGCGGC TGCCCGCCGG
 Taylorseq.
 151 GGATCTGAAC GAGTCATGCG GCGGGGCCGG AAGCCGAGGG ACCCGCGGAG
 201 GGGACCGGCG GCCCCGACG GCTGCCGGAG GGGCGGCCGT GCGTGGATGC
 251 GGCGGGAGCT GGAAGCCTCG AGCAGCCGCG GCCTTCTCTG GCCCCGGGCG
 RD2p.6 RD2.1
 301 CCATATGGCT TGAAG
 RD2.a
 taagaaccgg cgggggtggaa cgacagtctg tggcttctgc acgggtcgaa
 gcgtccagag ctgaccggcc aggaacagaa gtttgtccag ccaactctagc
 gccgcctgtc cegg **Intron I**
 AGCCG TGCCACCCAG TGGCCCCACT GCCCAATGG
 RD2.a
 351 ATCCACTGAA CCTGTCTGG TACGATGACG ATCTGGAGAG GCAGAACTGG
 401 AGCCGGCCCT TCAATGGGTC AGAAGGGAAG GCAGACAGGC CCCACTACAA
 451 CTACTATGCC ATGCTGCTCA CCCTCCTCAT CTTTATCATC GTCTTTGGCA
 501 ATGTGCTGGT GTGCATGGCT GTATCCGAG AGAAGGCTTT GCAGACCACC
 551 ACCAACTACT TGATAGTCAG CCTTGCTGTG GCTGATCTTC TGGTGGCCAC
 601 ACTGGTAATG CCGTGGGTTG TCTACCTGGA GGTGGTGGGT GAGTGAAAA
 651 TCAGCAGGAT TCACTGTGAC ATCTTTGTCA CTCTGGATGT CATGATGTG
 701 ACAGCAAGCA TCCTGAACCT GTGTGCCATC AGCATTGACA GGTACACAGC
 RD2.c
 751 TGTGGCAATG CCCATGCTGT ATAACACACG CTACAGCTCC AAGCGCCGAG
 801 TTACTGTCAT GATTGCCATT GTCTGGGTCC TGTCTTCAC CATCTCCTG
 851 CCACTGCTCT TCGGACTCAA CAATACAGAC CAGAATGAGT GTATCATTGC
 RD2.b
 901 CAACCCTGCC TTTGTGGTCT ACTCCTCCAT TGTCTCATT CACGTGCCCT
 951 TCATCGTCAC TCTGCTGGTC TATATCAAAA TCTACATCGT CCTCCGGAAG
 1001 CGCCGGAAGC GGGTCAACAC CAAGCGCAGC AGTCGAGCTT TCAGAGCCAA
 1051 CCTGAAGACA CCACTCAAGG GCAACTGTAC CCACCCTGAG GACATGAAAC
 RD2.cc
 1101 TCTGCACCGT TATCATGAAG TCTAATGGGA GTTTC^CCAGT GAACAGGCGG
 Insert 87 bp
 1151 AGAATGGATG CTGCCC^CCGG AGCTCAGGAG CTGGAAATGG AGATGCTGTC
 RD2.e
 1201 AAGCACCAGT CCCCAGAGA GGACCCGGTA TAGCCCCATC CCTCCAGTC
 1251 ACCACCAGCT CACTCTCCCT GATCCATCCC ACCACGGCCT ACATAGCAAC
 RD2.d
 1301 CCTGACAGTC CTGCCAAACC AGAGAAGAAT GGGCACGCCA AGATTGTCAA

1351 TCCCAGGATT GCCAAGTTCT TTGAGATCCA GACCATGCC AATGGCAAAA
1401 CCCGGACCTC CCTTAAGACG ATGAGCCGCA GAAAGCTCTC CCAGCAGAAG
1451 GAGAAGAAAG CCACTCAGAT GCTTGCCATT GTTCTCGGTG TGTTTCATCAT
1501 CTGTGGCTG CCCTTCTTCA TCACGCACAT CCTGAATATA CACTGTGATT
1551 GCAACATCCC ACCAGTCCTC TACAGCGCCT TCACATGGCT GGGCTATGTC
1601 AACAGTGCCG TCAACCCCAT CATCTACACC ACCTTCAACA TCGAGTTCCG
1651 CAAGGCCTTC ATGAAGATCT TGCACTGCTG AGTCTGCCCC TTGCCTGCAC
1701 AGCAGCTGCT TCCCACCTCC CTGCCTATGC AGGCCAGACC TCATCCCTGC
RD2.f RD2.3
1751 AAGCTGTGGG CAGAAAGGCC CAGATGGACT TGGCCTTCTC TCGACCCTGC
RD2.2
1801 AGGCCCTGCA GTGTTAGCTT GGCTCGATGC CCCTCTCTGC CCACACACCC
1851 TCATCTGCC AGGGTAGGGC CAGGGAGACT GGTATCTTAC CAGCTCTGGG
1901 GTTGGACCCA TGGCTCAGGG CAGCTCACAG AGTGCCCTC TCATATCCAG
1951 ACCCTGTCTC CTTGGCACCA AAGATGCAGC GGCCTTCCTT GACCTTCTC
2001 TTGGGCACAG AAAGTAGCTC AGTGGTCGAG CACACCCTGA TCGCTGGCTT
2051 GGCCTGGCCC TTGCTTGCCT GTGCCGATC AGGTGGTGGG AGGGAGCGAC
2101 AGTTCTTACT TTATAGGAAC CACATAGGAA AGCAGGGAAC ACGCCAAGTC
2151 CTCCAGGCAA CATCAGTGTC AGGAGACACA CATAAACACC AGGTAGCTCC
2201 ATGGACCCCA GAGAACTGA GGCTGAAAAA TCTGTTTTCC ACTCCAATC
2251 TAGTGTGAGT CCCTACTTTT CATAGCCATG GGTATTACTA TGTCTTACCT
2301 TGTTATAGTA TCCATGGGG TTTCTGTACC GTTGGGGGA AAACAATCT
2351 AATCCTCAAG GGCCCAAGA GAATCTGTAA GGAGAAAAAT AGGCTGATCT
2401 CCCTCTACTC TCCAATCCAC TCCACCACTT CTTGATATAC CTGATGTA
2451 TCCATTCTC ACAGCAAATG CTGGCCAGTC AGGCCTTGA CCAGTGTGG
2501 AGTTGAAGCT GGATGTGGTA ACTTGGGGCT CTTGGGGCT GGGGGGGTTG
2551 TTAACATCGT CTCTTTCCA TATCTTCTCC TTCCAGTGC CTCTGCCTTA
2601 GAAGAGGCTG TGGATGGGGT GCTGGGACTG CTGATACCAT TGGGCCTGGC
2651 CCTGAATGAG GAGGGGAAGC TGCAGTTTGG AGGGTTCTGG GATCCAATC
2701 TGTAACATCA CTATACCTGC ACCAAAATA ATAAAACCTT GACAAGAGTC

7.3 Die Fragen zur Einteilung alkoholabhängigen Patienten in Typ I und Typ II

(Gilligan et al., 1988)

7.3.1 Charakteristika für Typ I

- 1) Haben Sie sich jemals schuldig bezüglich des Trinkens gefühlt? (Ja)
- 2) Waren Sie jemals auf „Sauftour“ oder "Kneipentour", wo Sie für ein paar Tage oder länger tranken, ohne nüchtern zu werden? Wenn ja, haben Sie die Verantwortung für zwei oder mehrere Lebensbereiche vernachlässigt? (Ja)
- 3) Haben jemals versucht Ihr Trinken durch annehmen von bestimmten Regeln zu begrenzen oder zu kontrollieren, wie z.B. Whiskey zu vermeiden oder nicht alleine zu trinken oder nur in Bars zu trinken, oder ähnliche Regeln wie diese? (Ja)
- 4) Haben Sie jemals einen Leberschaden, eine Zirrhose oder Gelbsucht, wozu der Arzt sagte, daß es einen wahrscheinlichen einen Zusammenhang zu Ihrem Trinken gäbe? (Ja)
- 5) Waren Sie beim Beginn Ihre Probleme mit Alkohol jünger als 25 Jahre? (Ja)

7.3.2 Charakteristika für Typ II

- 1) Sind Sie jemals in eine körperliche Auseinandersetzung während des Trinkens geraten? (Ja)
- 2) Sind Sie jemals nach dem Trinken von Alkohol beim Führen eines Fahrzeuges in Schwierigkeiten geraten, wie z.B. in einen Unfall verwickelt, oder festgenommen worden aufgrund von Fahren unter Alkoholeinfluß? (Ja)
- 3) Haben Sie jemals Schwierigkeiten gehabt, völlig abstinent zu sein? Beispiel: haben Sie jemals geplant völlig damit aufzuhören oder gesagt, daß Sie aufhören werden, doch dann versagte Ihr ursprünglicher Plan?
- 4) Haben Sie jemals irgend eine Behandlung bezüglich Ihres Trinkens gemacht, andere als sich mit den anonymen Alkoholikern zu treffen? (Ja)

